



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

**MAESTRÍA EN CIENCIAS
EN PROTECCIÓN VEGETAL**

**MANEJO DE LA ANTRACNOSIS (*Colletotrichum fructicola*)
CON EXTRACTOS ORGÁNICOS EN FRUTOS DE AGUACATE
Hass EN POSCOSECHA**

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL**

PRESENTA:

SANDRA BERENICE JUÁREZ VÁZQUEZ

CHAPINGO, ESTADO DE MÉXICO, OCTUBRE DE 2016



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES



La presente tesis titulada **MANEJO DE LA ANTRACNOSIS (*Colletotrichum fructicola*) CON EXTRACTOS ORGÁNICOS EN FRUTOS DE AGUACATE Hass EN POSCOSECHA**, fue realizada por **Sandra Berenice Juárez Vázquez**, bajo la dirección y asesoría del consejo particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

CONSEJO PARTICULAR

DIRECTOR:



Dr. Mateo Vargas Hernández

ASESOR:



Dr. Marcelo Acosta Ramos

ASESOR:



Dra. María del Rosario García Mateos

Chapingo, Estado de México, Octubre de 2016

DEDICATORIAS

A mis padres, Alejandrino y Juanita

A mis hermanas y hermano, Alejandra, Mariana, Priscila y Edgar

A mis pequeñas sobrinas, Marian y Ángeles

A mi esposo, Dionicio

« Si bien la intención es la semilla de la manifestación, la acción es el agua que nutre la semilla. Sus acciones deben reflejar sus objetivos con el fin de alcanzar el verdadero éxito »

Steve Maraboli

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo, por darme la oportunidad de seguir creciendo profesionalmente.

Al Departamento de Parasitología Agrícola, por abrir sus puertas y hacer de mi estancia una de las mejores experiencias de vida.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por brindarme el apoyo financiero para llevar a cabo los estudios de maestría.

Al Dr. Mateo Vargas Hernández, por su apoyo en la dirección y desarrollo del presente trabajo.

A la Dra. María del Rosario García Mateos, por sus enseñanzas, paciencia y todo su apoyo para la realización de la presente investigación.

Al Dr. Marcelo Acosta Ramos, por su asesoría y apoyo en facilitar el material y las instalaciones para llevar a cabo el desarrollo de la investigación.

A la Dra. Hilda Silva Rojas, por sus aportaciones en la mejora de este trabajo, por su tiempo y ayuda en mi aprendizaje.

A mis compañeros y amigos de la Maestría en Protección Vegetal, en especial a Marina, Liz y José de Jesús por su compañía y consejos.

A la Ing. Leticia Rentería López, por todo su apoyo y confianza.

A mis Amigos, Erick Reyes Sánchez, Nestora Hernández Aquino, Carmen Álvarez Guadarrama, Ma. Lourdes Juárez Rangel, Roberto Carlos Hernández Suaste y compañeros del AICM T2 por todo su apoyo.

A Nayeli, Juan, Ángeles, Sergio por su orientación y compañía a lo largo de esta etapa.

Al señor José Remedios Ramírez y al señor Hipólito Genaro Hernández por toda su ayuda incondicional.

A todas aquellas personas que de manera indirecta han aportado un granito de arena para ayudarme a llegar hasta donde quiero estar, me siento afortunada de poder contar siempre con las personas indicadas para lograr cada una de mis metas.

DATOS BIOGRÁFICOS

Nació en Tepalcingo, Morelos; realizó sus estudios de nivel medio superior en la Preparatoria Agrícola en la Universidad Autónoma Chapingo en el periodo 2002- 2005, inició y terminó sus estudios de licenciatura en Ingeniería Agroindustrial en la Universidad Autónoma Chapingo en el periodo 2005-2009.

Año 2010 a 2012, se desempeñó como Auxiliar de Inspección y Manejador Canino en el Programa Operativo de Apoyo Técnico - Administrativo para el Fortalecimiento del Servicio de Inspección Fitozoosanitaria del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (IICA-SENASICA).

Año 2012 a 2014, se desempeñó como Oficial de Sanidad, Agropecuaria, Acuícola y Pesquera en el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA).

Año 2012-2013, realizó sus estudios como Técnico con Especialidad en Inglés.

Año 2014-2016, realizó estudios de Maestría en Protección Vegetal en el Departamento de Parasitología Agrícola en la Universidad Autónoma Chapingo.

ÍNDICE GENERAL

Contenido

CAPÍTULO I. REVISIÓN DE LITERATURA

1.1	EL CULTIVO DE AGUACATE.....	5
1.1.1	Producción mundial y nacional	5
1.1.2	Exportación.....	6
1.2	ANTRACNOSIS EN AGUACATE	7
1.2.1	Importancia	7
1.2.2	Agente causal.....	7
1.2.3	Ciclo del patógeno	8
1.2.4	Sintomatología.....	8
1.2.5	Epidemiología.....	9
1.2.6	Manejo	10
1.3	EXTRACTOS VEGETALES EN LA PROTECCIÓN DE CULTIVOS	12
1.3.1	Antecedentes.....	12
1.3.2	<i>Cestrum dumetorum</i>	14
1.3.3	<i>Phytolacca icosandra</i>	15
1.3.4	<i>Prosopis laevigata</i>	17
1.3.5	<i>Salvia leucantha</i>	19
1.3.6	<i>Sapindus saponaria</i>	20
1.4	Metabolitos secundarios con actividad fungicida	21
1.4.1	Alcaloides	21
1.4.2	Flavonoides.....	22
1.4.3	Terpenoides	22
1.5	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE HONGOS	23
1.5.1	Antecedentes.....	23
1.5.2	Técnicas de identificación	26

CAPÍTULO II. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LA ANTRACNOSIS (*Colletotrichum fructicola*) EN FRUTOS DE AGUACATE

1.1	INTRODUCCIÓN	29
-----	--------------------	----

1.2	OBJETIVOS	30
1.3	HIPÓTESIS	30
1.4	MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
1.4.1	Área de muestreo	31
1.4.2	Aislamiento y purificación	31
1.4.3	Prueba de patogenicidad.....	32
1.4.4	Identificación morfológica	32
1.4.5	Identificación molecular	33
1.5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
1.5.1	Prueba de patogenicidad.....	34
1.5.2	Identificación morfológica	34
1.5.3	Identificación molecular	36
1.6	CONCLUSIONES	38
 CAPITULO III. ENSAYOS DE ACTIVIDAD FUNGICIDA DE EXTRACTOS VEGETALES CONTRA <i>Colletotrichum fructicola</i>		
1.1	INTRODUCCIÓN	41
1.2	OBJETIVOS	42
1.3	HIPÓTESIS	42
1.4	MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
1.4.1	Recolección de material vegetal	43
1.4.2	Identificación taxonómica	43
1.4.3	Obtención de extractos vegetales	43
1.4.4	Evaluación <i>in vitro</i>	44
1.4.8	Análisis fitoquímico para determinación de metabolitos secundarios	47
1.5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
1.5.1	Identificación taxonómica del material vegetal.....	48
1.5.2	Obtención de extractos vegetales	48
1.5.3	Evaluación <i>in vitro</i>	50
1.5.4	Ensayo de inhibición de <i>P. laevigata</i> con concentraciones menores.....	61
1.5.5	Determinación de metabolitos secundarios	64

1.5.6.	Modelación del potencial de inhibición del extracto de <i>P. laevigata</i>	66
1.6	CONCLUSIONES	67
CAPITULO IV. MANEJO <i>in vivo</i> DE <i>Colletotrichum fructicola</i> EN FRUTOS DE AGUACATE cv. HASS		
1.1	INTRODUCCIÓN	68
1.2	OBJETIVO	69
1.3	HIPÓTESIS	70
1.4	MATERIALES Y MÉTODOS	70
1.4.1	Ensayo <i>in vivo</i>	70
1.4.2	Diseño experimental	71
1.4.3	Análisis estadístico	71
1.5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	71
1.6	CONCLUSIONES	78

ÍNDICE DE CUADROS

CAPITULO I. REVISIÓN DE LITERATURA

Cuadro 1.1. Principales clases de compuestos antimicrobianos de las plantas.....	23
Cuadro 1.2. Hospedantes y genes utilizados en el análisis multilocus para la identificación de <i>Colletotrichum fructicola</i>	24

CAPITULO III. ENSAYOS DE ACTIVIDAD FUNGICIDA DE EXTRACTOS VEGETALES CONTRA *Colletotrichum fructicola*

Cuadro 3.1. Familia, lugar de colecta y tipo de tejido empleado en la evaluación de actividad antifúngica contra <i>C. fructicola</i>	44
Cuadro 3.2. Comparaciones de medias del porcentaje de inhibición de los extractos metanólicos incluyendo a todos los tratamientos (especies y concentraciones).....	51
Cuadro 3.3. Comparaciones de medias para el porcentaje de inhibición de los extractos metanólicos, considerando solo la estructura factorial de los tratamientos para especie y concentración.....	51
Cuadro 3.4. Comparaciones de medias para el porcentaje de inhibición para diferentes concentraciones de extracto de <i>Prosopis laevigata</i> , usando el método de envenenamiento del medio.....	61
Cuadro 3.5. Metabolitos presentes en los extractos metanólicos de las especies evaluadas.....	65

CAPITULO IV. MANEJO *in vivo* DE *Colletotrichum fructicola* EN FRUTOS DE AGUACATE cv. HASS

Cuadro 4.1. Comparaciones de medias para los valores de inhibición a diferentes concentraciones de extracto de <i>P. laevigata</i> , y tres tiempos de aplicación.....	72
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPITULO I. REVISIÓN DE LITERATURA

Figura 1.1 Producción mundial de aguacate año 2013.....	5
Figura 1.2 Producción nacional de aguacate en México.....	6
Figura 1.3. Valor de las exportaciones de aguacate en México.....	7
Figura 1.4. Ciclo biológico de <i>Colletotrichum</i> spp.....	8

CAPÍTULO II. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LA ANTRACNOSIS (*Colletotrichum fructicola*) EN FRUTOS DE AGUACATE

Figura 2.1. Síntomas de antracnosis en el mesocarpio (A, B), exocarpio (C, E), frutos control (D) y conidios (F), después de 11 después de la inoculación.....	35
Figura 2.2. Morfología del hongo causal de la antracnosis en medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA) a 25 °C después de cinco d de incubación (A reverso y B anverso), en frutos de aguacate (C), conidios maduros (D) y apresorios producidos mediante cultivo en portaobjetos (E).....	36
Figura 2.3. Árbol filogenético de la región ITS del ADNr, construido con el método de máxima parsimonia, utilizando el algoritmo Subtree Pruning Regrafting. La confiabilidad de los nodos se generó con 1000 repeticiones bootstrap.....	40

CAPITULO III. ENSAYOS DE ACTIVIDAD FUNGICIDA DE EXTRACTOS VEGETALES CONTRA *Colletotrichum fructicola*

Figura 3.1. Representación gráfica del acomodo de los discos de papel Whatman No. 1 estériles, de 6 mm de diámetro impregnados con extracto dentro de cada caja Petri.....	45
--	----

Figura 3.2. Identificación taxonómica de <i>Cestrum dumetorum</i> Schlecht (A), <i>Sapindus saponaria</i> (B), <i>Phytolacca icosandra</i> L. (C), <i>Prosopis laevigata</i> (Willd) (D), <i>Salvia leucantha</i> Cav. (E).....	49
Figura 3.3. Efecto de los extractos metanólicos de <i>P. laevigata</i> (A: 75 %, B: 50 %, C: 25 %, D: 10 %), E: Control).....	53
Figura 3.4. Efecto de extractos metanólicos de plantas sobre el crecimiento micelial de <i>C. fructicola</i> por método de discos.	53
Figura 3.5. Efecto del extracto metanólico de <i>S. saponaria</i> (A: 75 %, B: 50 %, C: 25 %, D: 10 %), E: Control).....	54
Figura 3.6. Efecto de extracto metanólico de <i>P. icosandra</i> . (A: 75 %, B: 50 %, C: 25 %, D: 10 %), E: Control).....	55
Figura 3.7. Efecto del extracto metanólico de <i>S. leucantha</i> (A: 75 %, B: 50 %, C: 25 %, D: 10 %), E: Control).....	56
Figura 3.8. Efecto del extracto metanólico de <i>C. dumetorum</i> (A: 75 %, B: 50 %, C: 25 %, D: 10 %), E: Control).....	57
Figura 3.9. Efecto de extractos hexánicos de plantas sobre el crecimiento micelial de <i>C. fructicola</i> por método de discos.	60
Figura 3.10. Efecto de los extractos hexánicos de <i>P. laevigata</i> (A), <i>S. leucantha</i> (B), <i>C. dumetorum</i> (C), a 20 % de concentración.....	60

Figura 3.11. Efecto de extractos metanólicos de *P. laevigata* sobre el crecimiento micelial de *C. fructicola* por el método de envenenamiento del medio.....63

Figura 3.12. Efecto de extracto metanólico de *P. laevigata* a concentraciones bajas, A (1 %), B (5 %), C (10 %), D (15 %), E (20 %) y F (Control).....63

Figura 3.13. Análisis fitoquímico por cromatografía de capa fina para determinación de flavonoides (A), terpenoides (B) y alcaloides (C). 1, *P. icosandra*; 2, *S. leucantha*; 3, *S. saponaria*; 4, *C. dumetorum*; 5, *P. laevigata*.....65

Figura 3.14. Comportamiento del modelo de Regresión Polinomial de grado cubico completo. Para valores de concentración del extracto de *P. laevigata* en el rango de 1 a 25 %.....67

CAPITULO IV. MANEJO *in vivo* DE *Colletotrichum fructicola* EN FRUTOS DE AGUACATE cv. HASS

Figura 4.1. Efecto de la concentración de extracto metanólico de *P. laevigata* en la inhibición de *C. fructicola* en frutos de aguacate Hass.72

Figura 4.2. Efecto del momento de aplicación del extracto metanólico de *P. laevigata* en la inhibición de *C. fructicola* en frutos de aguacate Hass.....73

Figura 4.3. Efecto en la inhibición de *C. fructicola* con extracto metanólico de *P. laevigata*, Control positivo, Control negativo, Tiabendazol, y *Bacillus* spp; con aplicación del extracto 24 h antes de la inoculación, al mismo tiempo de la inoculación, y 24 h después de la inoculación.....75

**MANEJO DE LA ANTRACNOSIS (*Colletotrichum fructicola*)
CON EXTRACTOS ORGÁNICOS EN FRUTOS DE AGUACATE *Hass*
EN POSCOSECHA
ANTHRACNOSE (*Colletotrichum fructicola*) MANAGEMENT WITH PLANT
EXTRACTS IN POSTHARVEST *Hass* AVOCADO FRUITS**

Sandra Berenice Juárez Vazquez¹ y Mateo Vargas Hernández²

RESUMEN

Los metabolitos secundarios (MS) sirven como mecanismos de defensa de las plantas y han demostrado tener un efecto antimicrobiano. El objetivo del presente trabajo fue evaluar extractos metanólicos y hexánicos de cinco especies de plantas, sobre el control de antracnosis en condiciones *in vitro* e *in vivo* en frutos de aguacate *Hass*. La identificación del patógeno se realizó morfológica y molecularmente; los extractos se obtuvieron mediante un equipo Soxhlet. Las especies de plantas evaluadas fueron: *Prosopis laevigata*, *Sapindus saponaria*, *Phytolacca icosandra*, *Salvia leucantha* y *Cestrum dumetorum* y se emplearon dos métodos de evaluación *in vitro*; i) método de difusión de discos y ii) método de envenenamiento del medio, para confirmar la actividad fungicida de *P. laevigata*. Se realizó el análisis fitoquímico cualitativo de las cinco especies. El análisis estadístico consistió en análisis de varianza y comparación de medias por el método de Tukey (P=0.05). Los resultados mostraron que *C. fructicola* fue causante de la antracnosis en frutos de aguacate provenientes de Molango de Escamilla, Hidalgo. El extracto metanólico de *P. laevigata* fue el que presentó mayor efecto inhibitorio contra *C. fructicola*, tanto *in vitro* (65.24 %) como *in vivo* debido a la presencia simultánea de flavonoides, terpenoides y alcaloides, encontrados en el análisis fitoquímico.

Palabras clave: *Colletotrichum fructicola*, *Prosopis laevigata*, extractos metanólicos.

1 Tesista

2 Director

ABSTRACT

Secondary metabolites (SM) serve as plant defense mechanisms and have been shown to have an antimicrobial effect. The aim of this study was to evaluate the effect of methanol and hexane extracts from five plant species on anthracnose control under *in vitro* and *in vivo* conditions in *Hass* avocado fruits. The identification of the pathogen was performed morphologically and molecularly; the extracts were obtained by Soxhlet equipment. The Plant species evaluated were: *Prosopis laevigata*, *Sapindus saponaria*, *Phytolacca icosandra*, *Salvia leucantha* and *Cestrum dumetorum* and two methods of evaluation were used *in vitro*; i) disk diffusion method and ii) Poison Food Technique in solid media, to confirm the fungicidal activity of *P. laevigata*. Phytochemical qualitative analysis was performed for the five species. The statistical analysis consisted of analysis of variance and means comparison using the Tukey test (P = 0.05). The results showed that *C. fructicola* was the agent causing anthracnose in avocado fruits from Molango de Escamilla, Hidalgo. The methanol extract of *P. laevigata* had the highest inhibitory effect against *C. Fructicola*, both *in vitro* (65.24%) and *in vivo* due to the simultaneous presence of flavonoids, terpenoids, and alkaloids found in the phytochemical analysis.

Keywords: *Colletotrichum fructicola*, *Prosopis laevigata*, methanol extracts

INTRODUCCIÓN GENERAL

En el mundo la agricultura ha sufrido baja en la producción de alimentos debido a enfermedades en pre y poscosecha causadas por hongos, bacterias, virus y otros agentes (Singh *et al.*, 2009). Las acciones para el control de estas enfermedades han sido el uso de fungicidas sintéticos de manera indiscriminada causando resistencia de los microorganismos, contaminación de la atmósfera y efectos perjudiciales en la salud de los seres humanos debido a los residuos tóxicos que se encuentran en los alimentos de consumo humano (Jasso *et al.*, 2011). El aguacate es un fruto perecedero con alta tasa metabólica que resulta en una vida útil de tan sólo tres a cuatro semanas a temperatura y humedad relativa óptimas (Yahia y Gonzalez-Aguilar, 1998), además, es un producto con alto valor para la exportación lo cual hace que lograr una buena calidad a su destino final sea un reto importante (Kassim *et al.*, 2013). El principal problema poscosecha en aguacate es debido a especies del género *Colletotrichum*, las cuales causan síntomas típicos conocidos como antracnosis, caracterizados por tejido necrótico hundido donde se producen masas de conidios color naranja. Para el manejo poscosecha de la antracnosis en aguacate, generalmente se han empleado fungicidas químicos, siendo procloraz de los más efectivos (Muirhead *et al.*, 1982). Sin embargo, algunas especies de *Colletotrichum* han desarrollado resistencia a algunos fungicidas químicos tales como benzimidazoles y quinonas (Meazza *et al.* 2003); aunado a lo anterior, el incremento en la demanda de alimentos naturales ha llevado a la investigación de agentes antimicrobianos alternativos dentro de la industria alimentaria (Temesgen *et al.*, 2015). Hay muchas investigaciones que demuestran que el uso de extractos de plantas puede ser una alternativa de manejo de enfermedades fitopatógenas, además de ser seguros para el medio ambiente y no causar daños a los consumidores.

Considerando la información antes expuesta, el presente trabajo se integró de cuatro capítulos, en el primer capítulo se abordó la información documental existente acerca de *Colletotrichum fructicola*, su identificación y control con extractos vegetales, así como, los antecedentes respecto a los estudios de la actividad fungicida de las especies *Prosopis laevigata*, *Sapindus Saponaria*, *Phytolacca icosandra*, *Salvia leucantha* y *Cestrum dumetorum* y su descripción botánica. El segundo capítulo consistió en la identificación morfológica y molecular de la antracnosis (*C. fructicola*) en frutos de aguacate, el tercer capítulo se desarrolló para evaluar la actividad fungicida de los extractos metanólicos de las cinco especies y extractos hexánicos de *P. laevigata*, *Salvia leucantha* y *Cestrum dumetorum* utilizando dos métodos de evaluación: método de difusión de discos y método de envenenamiento del medio, finalmente, en el cuarto capítulo se evaluó *in vivo* la actividad fungicida del extracto metanólico de *P. laevigata*, el cual fue el que presentó mayor actividad fungicida. Si bien existen estudios donde se evalúa la actividad fungicida de extractos vegetales de los mismos géneros estudiados en el presente trabajo, cabe mencionar que el efecto de un extracto va a estar influenciado por diferentes factores como a) especie del hongo; b) patogenicidad del hongo; c) disolvente utilizado; d) mecanismos de resistencia (enzimáticos, estructurales, cambio de la permeabilidad de la membrana que le permitan aprovechar, evitar o detoxificar alguno de los compuestos presentes en los extractos vegetales) (Díaz, 2016), de lo anterior se deriva que el objetivo general fue identificar morfológica y molecularmente al patógeno causante de la antracnosis en frutos de aguacate provenientes de Molango, Hidalgo, evaluar *in vitro* los extractos metanólicos de cinco especies y extractos hexánicos de tres especies en el control de *C. fructicola* y evaluar la actividad fungicida *in vivo* del extracto metanólico de *P. laevigata* en frutos de aguacate Hass.

CAPITULO I. REVISIÓN DE LITERATURA

1.1 EL CULTIVO DE AGUACATE

1.1.1 Producción mundial y nacional

El origen de esta especie se sitúa en el área entre México y Guatemala. Según datos de FAOSTAT, la producción mundial de aguacate para el año 2013 se estimó en 4 717 102 t. En México se obtuvo el 31 % de la producción mundial con 1 467 837 t, por lo cual se considera el mayor productor en el mundo. Los principales productores para el año 2013 fueron México, República Dominicana, Colombia, Perú e Indonesia (Figura 1.1) (FAOSTAT, 2013).



Figura 1.1 Producción mundial de aguacate año 2013 (FAOSTAT, 2013)

A nivel nacional las entidades con mayor producción son: Michoacán, 1 219 553.58 t; Jalisco, 100 250.33; Estado de México, 64 928.13; Nayarit, 36 691.01 y Morelos, 27 656.05 t (SIAP, 2014) (Figura 1.2).

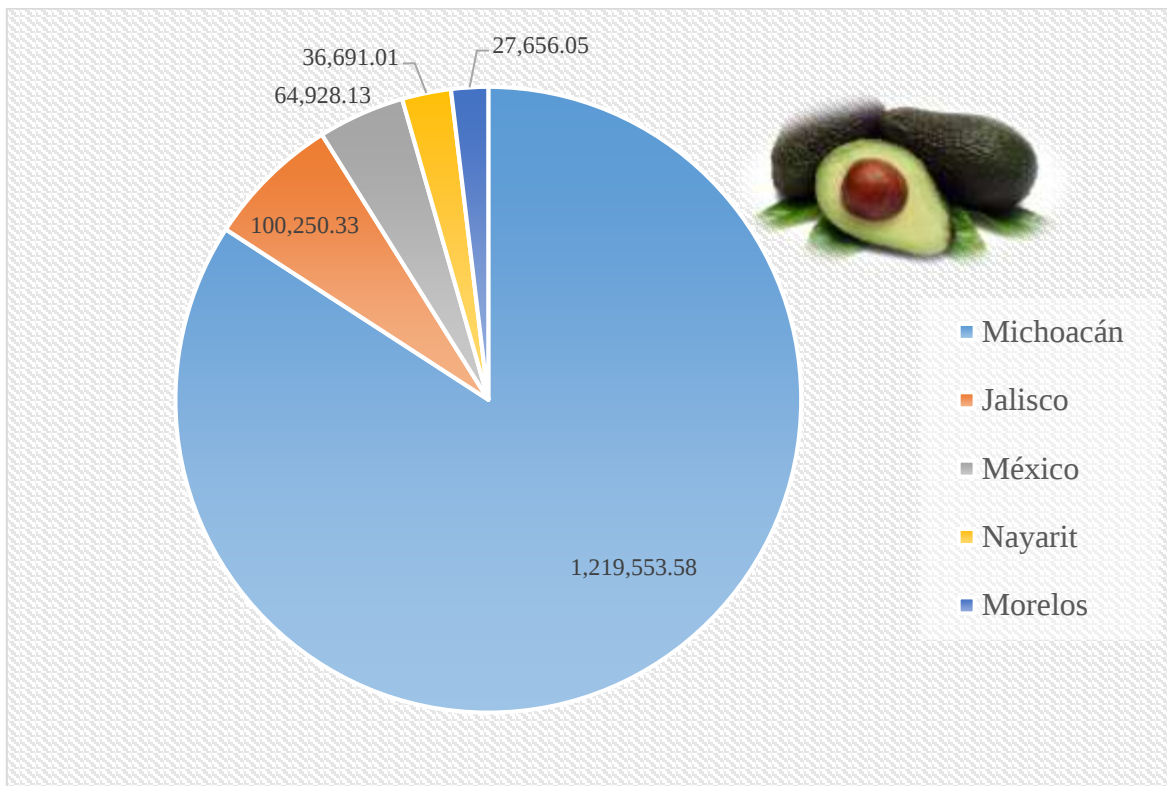


Figura 1.2 Producción nacional de aguacate en México (SIAP, 2014)

1.1.2 Exportación

El aguacate mexicano para el primer semestre del año 2014 fue comercializado en 21 mercados entre los que resaltan por su valor económico: Estados Unidos, Japón, Canadá, Costa Rica, El Salvador, Honduras, Francia, Guatemala, España, China, Países Bajos, Hong Kong, Reino Unido, Alemania, Singapur y Bélgica. En Estados Unidos, principal mercado de exportación, se comercializó aguacate con un valor de 651 millones 328 mil dólares, lo que significó un incremento de 31 por ciento en comparación con el lapso enero-junio del año 2013 (SAGARPA, 2014).

En un análisis de las exportaciones de aguacate en México con datos evaluados durante diez años (periodo 2003-2013), se observa que éstas han aumentado, iniciando con un valor de 124

239 t en el año 2003 a 563 492 t para el año 2013; lo cual indica que el sistema producto aguacate es uno de los más importantes para la generación de divisas en México (Figura 1.3).

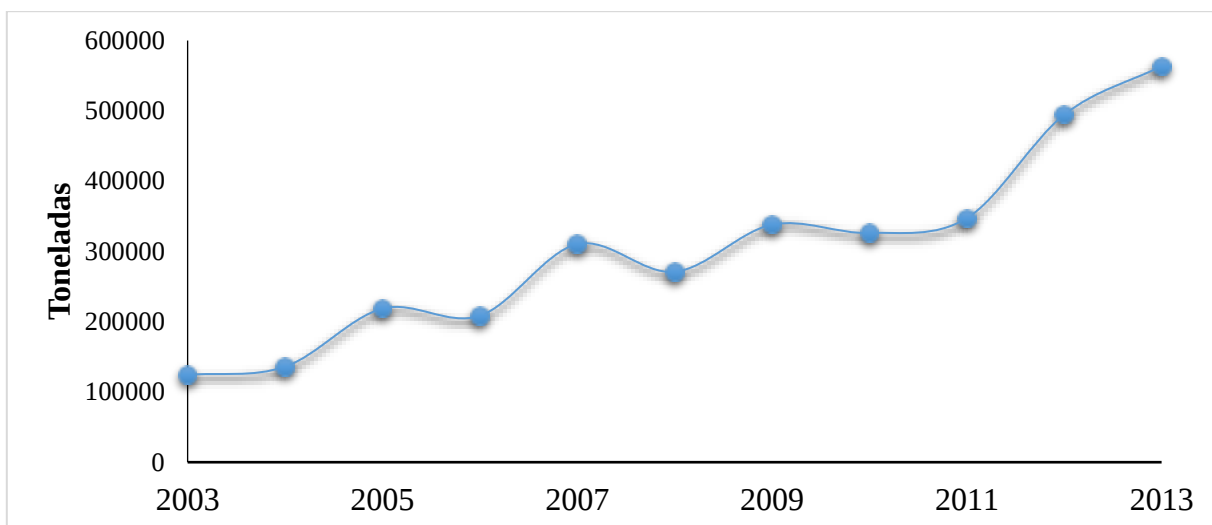


Figura 1.3. Valor de las exportaciones de aguacate en México (2003-2013). (FAOSTAT, 2013)

1.2 ANTRACNOSIS EN AGUACATE

1.2.1 Importancia

La antracnosis es la pudrición de frutos maduros de aguacate más común, además de generar efectos también en las hojas, tallos y frutos jóvenes. La enfermedad ha sido reportada en la mayoría de las áreas productoras de aguacate en el mundo. En diversos lugares, es la enfermedad más importante y puede causar pérdidas de frutos de más del 37 %, particularmente en los cultivares más susceptibles y áreas con altas precipitaciones (Menge y Ploetz, 2003).

1.2.2 Agente causal

Generalmente se ha atribuido a *Colletotrichum gloeosporioides* y *C. acutatum* ser los causantes de la antracnosis en aguacate (Cooke *et al.*, 2009). Sin embargo, se han reportado diversidad de especies afectando al aguacate, las cuales han sido identificadas con análisis filogenético

multilocus. Según el Centro Nacional de Información Biotecnológica de Estados Unidos (NCBI, 2016), *Colletotrichum* pertenece al reino Fungi, phylum Ascomycota; clase Sordariomycetes; orden Glomerellales y familia Glomerellaceae.

1.2.3 Ciclo del patógeno

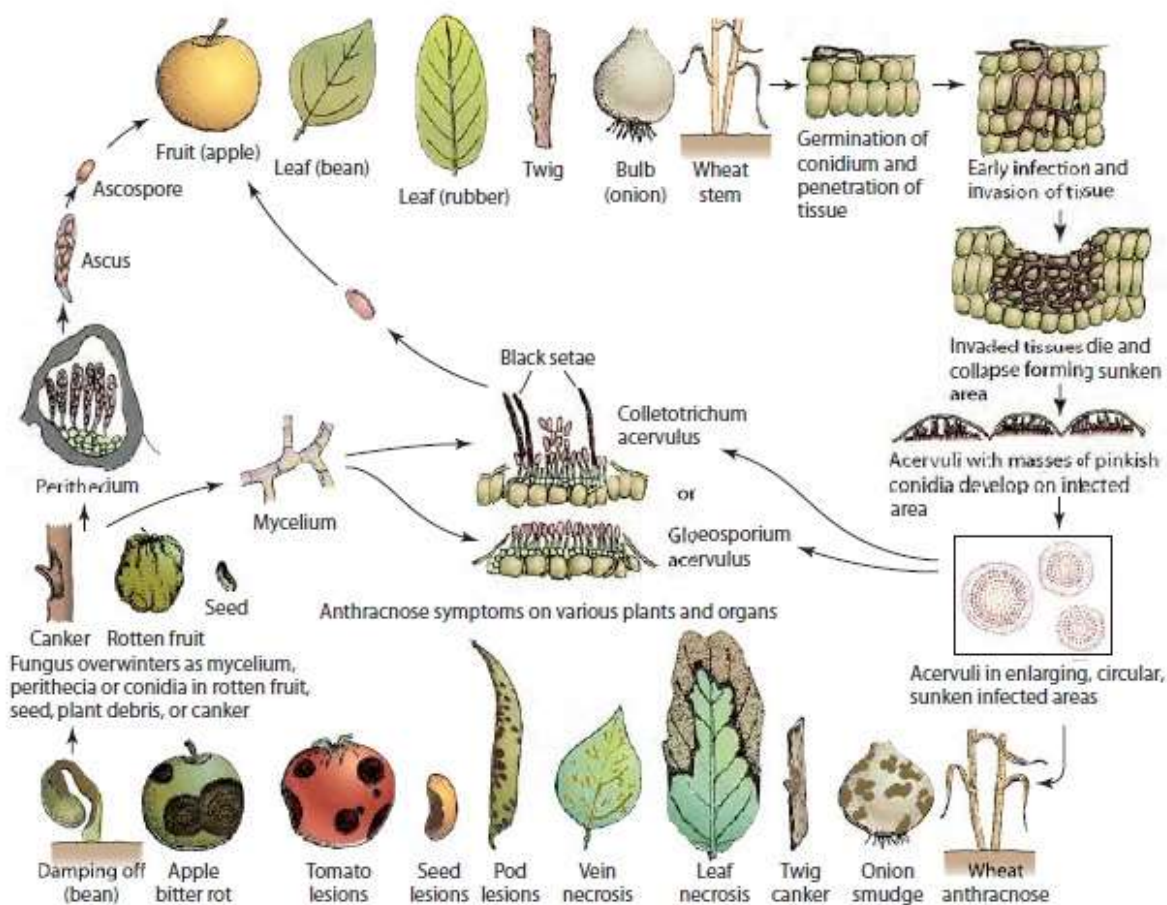


Figura 1.4. Ciclo biológico de *Colletotrichum* spp. (Agrios, 2005).

1.2.4 Sintomatología

Los síntomas pueden ocurrir en frutos maduros o inmaduros. En frutos maduros, los síntomas al principio aparecen como manchas pequeñas, circulares y café claras. Estas manchas se

alargan rápidamente y cambian de color de café oscuro a negro. Los centros de las manchas pueden estar ligeramente hundidas y, si los frutos se mantienen en un ambiente húmedo, se desarrollan masas de conidios rosas sobre las manchas. La pudrición puede penetrar profundamente en el mesocarpio de los frutos (Cooke *et al.*, 2009). En las hojas, aparecen lesiones cloróticas, posteriormente necróticas, cafés, las cuales coalescen para formar un ápice muerto. Ocasionalmente, los síntomas en las hojas son severos causando defoliación del árbol. En las inflorescencias, se forman lesiones negras causando su muerte o aborto de frutos (Menge y Ploetz, 2003).

1.2.5 Epidemiología

En el campo, produce conidios en acérvulos en residuos de plantas. Se propagan por salpicamiento con la lluvia, y pueden infectar cualquier parte de los hospedantes, pero las flores y los frutos son los más susceptibles. La infección y esparcimiento es favorecido por alta humedad y clima cálido, con una temperatura óptima de 28 °C (Menge y Ploetz, 2003). En presencia de agua en la superficie de los tejidos del fruto, los conidios germinan en 7 h. Cada conidio germinado produce un tubo germinativo que alcanza una longitud de 10-20 μm . Aproximadamente de 5 a 6 h después de la emergencia del tubo germinativo, comienza el desarrollo de un apresorio. Inicialmente el apéndice del tubo germinativo se hincha, y al alcanzar el máximo tamaño, la pared del apresorio engruesa y oscurece considerablemente, y un poro germinativo central se desarrolla en la pared ventral. Posteriormente, una clavija de infección emerge de este poro germinativo y penetra en la capa exterior de cera y la cutícula de la epidermis del fruto (Dann *et al.*, 2013).

Los frutos de aguacate infectados pueden ser cosechados sin ningún síntoma visible, pero la enfermedad se desarrolla posteriormente durante el almacenamiento y comercialización (Barkai-Golan, 2001).

1.2.6 Manejo

Algunos cultivares, tales como ‘Fuerte’, ‘Ricon’ y ‘Wurtz’, son más susceptibles a la antracnosis que el cultivar ‘Hass’ (Menge y Ploetz, 2003). Los patrones utilizados para el injerto pueden influenciar en la incidencia y severidad de la enfermedad. Cuando el cv. *Hass* fue injertado en el patrón cv. Velvick, se redujo la incidencia de la antracnosis en frutos, que cuando se injertó en el cv. Duke 6, debido posiblemente a la diferente capacidad de absorción de Ca por translocación hacia los frutos (Hofman *et al.*, 2002b). La resistencia a la antracnosis en frutos inmaduros está correlacionado con la presencia de altas concentraciones de compuestos antifúngicos preformados. Los mayores compuestos antifúngicos que han sido reportados son 1-acetoxi-2-hidroxi-4-oxo-heneicosa-12, 15 dieno y 1-acetoxi-2,4dihidroxi-n-heptadeca-16-eno. Por lo tanto, los cultivares que son más susceptibles a la enfermedad muestran un rápido decremento en ambos compuestos durante la maduración del fruto (Prusky, 1996). Además del Ca, también se ha correlacionado la baja concentración de Mg y K en el fruto y alta severidad de antracnosis (Marques *et al.*, 2006).

En cuanto al manejo biológico, la aplicación de *Bacillus subtilis* al momento del empaque resultó en un buen control de la antracnosis (Korsten *et al.*, 1995). Sin embargo, la dificultad en la comercialización de los productos biológicos, principalmente debido al tamaño limitado del mercado, altos costos de desarrollo y eficacias inconsistentes, son las mayores barreras (Dann

et al., 2013). Además, las condiciones en poscosecha están bastante estables, por lo cual generalmente se cree que los microorganismo antagonistas son exitosos, sin embargo, uno de los mayores obstáculos del desarrollo de productos biológicos para el tratamiento poscosecha es que son incapaces de controlar infecciones latentes; por tanto, las aplicaciones precosecha podrían evitar la colonización de los patógenos, representando un gran reto debido a que los organismos deben ser tolerantes a baja disponibilidad de nutrientes, radiación UV, altas temperaturas y condiciones de sequía (Ippolito y Nigro, 2000).

Los fungicidas químicos se han utilizado en algunos países, pero no están registrados para su uso en Estados Unidos. Se ha reportado que el tratamiento poscosecha con procloraz al 2 % y benomil al 0.05 % + procloraz al 0.05 % controla satisfactoriamente la antracnosis después de 16 d de almacenamiento a 13 °C (McMillan y Narayanan, 1990). Sin embargo, los más utilizados son los fungicidas aplicados antes de la cosecha, como hidróxido de cobre, óxido de cobre y oxicloruro de cobre (Dann *et al.*, 2013). En algunos países, se utiliza estrobilurinas, como azoxistrobin, intercalando con compuestos cúpricos y reduciendo el número de aplicaciones para evitar la resistencia (Coates *et al.*, 2001).

En cuanto a medidas culturales, remover frutos infectados, ramas muertas y hojas reduce el nivel de inóculo. La ventilación dentro de la copa del árbol se puede mejorar con la poda, proporcionando condiciones menos favorables para la acumulación del inóculo (Dann *et al.*, 2013). En poscosecha, se recomienda refrigerar los frutos a 7 °C tan pronto sean cosechados. Temperaturas más bajas después de la cosecha podrían causar daño por frío. Los retrasos de más de seis h antes del enfriamiento incrementan los daños por antracnosis (Cooke *et al.*, 2009). Sin embargo, almacenar frutos cv. *Hass* parcialmente maduros, por 4 d a 1, 5 o 12 °C, no altera su

calidad, mientras que almacenarlos por largos períodos (14 d), puede ser problemático debido a la estimulación del desarrollo de pudrición y pigmentación rosada de la pulpa (Arpaia *et al.*, 2015). El encerado (17.2 % carnauba + 1.8 % goma laca) del fruto con doble capa decrece el daño por frío, el metabolismo y producción de etileno, y prolonga el período de comercialización del fruto almacenado a 3 °C por 46 d (Mendieta *et al.*, 2016). También se ha obtenido buena desinfección de frutos con agua caliente (42 °C) por 25 min después de la desinfección en frío (Hofman *et al.*, 2002a). Para favorecer la madurez del fruto, se realiza a menudo la aplicación de etileno durante el almacenamiento en frío, lo que puede causar decoloración del mesocarpio. El uso de bolsitas absorbentes que remueven el etileno de atmósferas modificadas reduce estos daños (Pesis *et al.*, 2002).

El manejo poscosecha no debe ser el único para evitar enfermedades, se debe tomar en cuenta también desde el manejo en campo para disminuir el desarrollo de enfermedades en almacenamiento. La aplicación de Ca es recomendada para disminuir la incidencia de pudriciones poscosecha de frutos (Everett *et al.*, 2007), igualmente las aplicaciones excesivas de N inorgánico incrementa la incidencia y severidad de la antracnosis (Willingham *et al.*, 2006).

1.3 EXTRACTOS VEGETALES EN LA PROTECCIÓN DE CULTIVOS

1.3.1 Antecedentes

México posee una ubicación privilegiada en la superficie terrestre, funciona como un puente entre los dos subcontinentes. Su orografía y grandes costas hacen un ambiente diverso y ecológico único, capaz de albergar numerosas especies de vegetales. Los metabolitos

secundarios (MS) son compuestos bioactivos de bajo peso molecular que son considerados como no esenciales para el mantenimiento de la vida, pero cruciales para la supervivencia del organismo productor (Yazdani *et al.*, 2011), en muchos casos sirven como mecanismos de defensa de las plantas contra depredación por microorganismos, insectos y herbívoros. Diversos productos derivados de las plantas han demostrado tener un efecto antimicrobiano. Entre estos compuestos destacan los flavonoides, fenoles, terpenos, aceites esenciales, alcaloides, lectinas y polipéptidos (Cowan, 1999). Los MS son producidos en rutas específicas y los sitios de síntesis pueden variar entre los tipos de compuestos y entre especies de plantas. Además, algunos compuestos pueden ser producidos por todos los tejidos, mientras que otros se producen en un tipo de tejido o incluso en células específicas (Yazdani *et al.*, 2011). Se ha encontrado que los extractos de algunas especies de plantas son activas contra muchos hongos fitopatógenos sin tener efectos secundarios nocivos. Algunos extractos de plantas actúan como fungicidas de contacto, algunos interrumpen la integridad de la membrana celular en diferentes etapas de desarrollo del hongo, mientras que otros inactivan enzimas clave e interfieren con los procesos metabólicos (Dimetry, 2014).

Se ha encontrado que numerosas especies de plantas de México contienen metabolitos antifúngicos, especialmente las familias Asteraceae, Labiatae, Fabaceae y Brassicaceae, para las cuales ha sido determinada su actividad fungicida a través de análisis (Damian *et al.*, 2008). Sin embargo, existen algunas que no se han estudiado como *Cestrum dumetorum*, *Phytolacca icosandra*, *Prosopis laevigata*, *Salvia leucantha* y *Sapindus saponaria*, por lo tanto, se determinó la actividad fungicida en *Colletotrichum fructicola*.

1.3.2 *Cestrum dumetorum*

1.3.2.1 Descripción botánica

El género *Cestrum* contiene más de 300 especies, y la mayoría de ellas son nativas de áreas tropicales y subtropicales de América (Khan *et al.*, 2011), pertenece a la familia *Solanaceae* y son arbustos o árboles pequeños; perennes o caducos. Tallos erectos o dispersos o trepadores. Hojas estrechas; lanceoladas elípticas u ovals u oblongas; márgenes enteros. Inflorescencias en racimos de flores; terminal o axilar. Flores aromáticas o no aromáticas. Cálices cortos; de tubular a acampanado; 5 -dentada o 5 -lobulada. Corolas de simetría radial; 5 -lobulada; amarilla o roja o blanca o verdosa; en forma de bandeja o forma de embudo. Pétalo con lóbulos agudos; de erectos a dispersos o reflejados. Cinco estambres; iguales o desiguales; incluidos dentro de corolas. Las frutas son bayas pequeñas; de globosas a elipsoidales; color blanquecino o rojo o negro o violeta-marrón; 2 lóculos (Burrows y Tyrl, 2013).

1.3.2.2 Importancia

El género *Cestrum* tiene muchas aplicaciones en la medicina folclórica, por ejemplo, *C. parqui* se utiliza como tratamiento para la fiebre y la inflamación, en China se utilizan las hojas de *C. nocturnum* por su importancia farmacológica en quemaduras e inflamaciones y en Las Islas del oeste de India se utiliza como tratamiento para la epilepsia y como estupefaciente (Al-Reza *et al.*, 2010). No existen estudios de *Cestrum dumetorum* Schlecht de la actividad fungicida, sin embargo, estudios hechos en plantas del mismo género podrían dar una visualización general de los efectos fungicidas que esta especie pudiera tener. Se ha encontrado que los extractos metanólicos de *C. nocturnum* L. tiene un efecto inhibitorio significativo del crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer*, *Fusarium spp.* (Barrera-Necha y Bautista-Baños, 2008; Bautista-Baños

et al., 2008), *F. solani* (78,9 %), *B. cinerea* (76,3 %), *S. sclerotiorum* (75,2 %), *R. solani* (72,1 %), *P. capsici* (68,4 %) y *F. oxysporum* (67,0 %) (Al-Reza *et al.*, 2010). En otro estudio se evaluó el efecto del extracto crudo de *C. nocturnum* L. en la germinación conidial de *Colletotrichum gloeosporioides* mostrando el mejor efecto fungicida dentro de las 40 especies de plantas estudiadas (Hernández-Albíter *et al.*, 2007).

1.3.3 *Phytolacca icosandra*

1.3.3.1 Descripción botánica

Phytolacca icosandra (*Phytolaccaceae*) es un arbusto originario de América tropical (desde México hasta Perú y encontrado también en las islas del Caribe), pero que ahora se ha naturalizado en las regiones montañosas del centro y el este de la Isla de Java. Es una maleza nociva en Australia, Nueva Zelanda y Sudáfrica (Treyvaud *et al.*, 2000). Es anual o perenne de vida corta, con frecuencia robusta, poco pubescente y algo succulenta. Puede llegar a medir hasta 2 m, sus tallos son ramificados, huecos y angulosos, mientras que las hojas elípticas u ovado-elípticas, de 7-20 cm de largo y 2.5 a 9.5 de ancho. Posee inflorescencias en racimos axilares y terminales, de 8 a 15 cm, con flores subsésiles o sobre pedicelos de 2 a 5 cm de largo. Sus frutos son carnosos de forma globosa-aplanados, de 6 a 8 cm de diámetro, color verde cuando son tiernos y pasando a negro cuando son maduros. La semilla es negra, de 2.5 mm de largo (CONABIO, 2016).

1.3.3.2 Importancia

La química de *Phytolaccaceae* es bastante amplia y comprende una variedad de metabolitos secundarios, tales como saponinas, flavonoides y ligninas (Williams *et al.*, 2002). Hay una

historia de la presencia de los principios activos en los extractos acuosos y alcohólicos de las hojas y frutos de varias especies del género *Phytolacca*, con acción analgésica, antiinflamatoria, bactericida, fungicida, molusquicida y mitogénica (Hernández *et al.*, 2013). Diferentes saponinas en extractos acuosos han mostrado efecto espermicida y hemolítica (Treyvaud *et al.*, 2000). En uso veterinario en condiciones *in vitro*, los extractos etanólico y diclorometano inhibieron la migración larval de *Haemonchus contortus*, un nematodo parásito de cabras y ovejas. Además, el extracto etanólico inhibió al 72.25 % la eclosión de los huevecillos. Estos efectos son atribuidos a los terpenoides, flavonoides, esteroides, cumarinas y/o saponinas que estuvieron presentes en los extractos evaluados (Hernández-Villegas *et al.*, 2011). En ensayos *in vivo* con los mismos extractos, mostraron reducción de huevecillos del nematodo en las heces fecales de las cabras, a las cuales se les administraron 250 mg kg⁻¹ de extracto etanólico vía oral, sin causar ningún efecto negativo en la salud de los animales (Hernández-Villegas *et al.*, 2012). Por otra parte, *P. icosandra* es capaz de sobrevivir en suelos contaminados con hidrocarburos y cadmio, propiedades que la hacen adecuada para uso en fitorremediación de suelos (González-Chávez *et al.*, 2009; Rodríguez-Vázquez *et al.*, 2016). En el área agrícola, se ha evaluado su fitotoxicidad para el control de *Trialeurodes vaporariorum* W. encontrando que los extractos metanólicos y acuosos de *P. icosandra* mostraron la más alta toxicidad bajo condiciones de laboratorio (39.5 y 40.5 %, respectivamente) e invernadero (23.3 y 26.3 %, respectivamente) (Ángeles-Martínez *et al.*, 2011)

1.3.4 *Prosopis laevigata*

1.3.4.1 Descripción botánica

El género *Prosopis*, al cual pertenece el mezquite, es una planta silvestre de la familia *Leguminosae* (Fabaceae), subfamilia *Mimosoideae*. *Prosopis* (Gallegos-Infante *et al.*, 2013) comprende cerca de 44 especies en las regiones secas, calurosas del mundo, donde dominan la vegetación (Burrows y Tyrl, 2013). En las regiones secas y calurosas de México crecen nueve especies de *Prosopis* de manera natural en un área que cubre 3.5 millones de ha. *Prosopis laevigata* se puede encontrar en algunas localidades de Guerrero, Querétaro, Estado de México, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí, Veracruz, Nuevo León, Aguascalientes, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco y Zacatecas (Carrillo *et al.*, 2008). Su madera se usa para madera, pisos y leña. Produce abundante néctar, sus flores son fácilmente visitadas por abejas, quienes producen una miel dulce (Burrows y Tyrl, 2013). Son plantas perennes; árboles de forma irregular o arbustos grandes; follaje grisáceo. Tallos erectos o ascendentes; corteza de color marrón oscuro, áspero, surcada; ramas rígidas, de color marrón grisáceo, en zigzag, con espuelas cortas, armado con 1 o 2 espinas gruesas en los nodos, yemas terminales ausentes. Hojas alternadas, cortas en los extremos de las espuelas; bipinada compuesta, de forma dicotómica bifurcada; de 12 -36 foliolos, limbo de lineal a oblongo, ápices obtusos o apiculada, márgenes enteros; estípulas modificadas en espinas. Inflorescencias elongadas en racimo o espigas; transmitidas en ramales; normalmente pendular. Flores fragantes; numerosas; pequeñas; perfectas; radialmente simétricas. 5 sépalos; fusionados. 5 pétalos; libres; de color blanco cremoso a amarillo pálido. 10 estambres. Legumbres cilíndricas; constreñidas

ligeramente entre las semillas; de 7 de 25 cm de largo; amarillo bronceado; indehiscente. 5 -18 semillas; duras; marrón; brillantes (Burrows y Tyrl, 2013).

1.3.4.2 Importancia

Los extractos metanólicos de *P. laevigata* se han evaluado en nematodos parásitos de animales, principalmente rumiantes, teniendo efecto en pruebas *in vivo* de mortalidad contra *Haemonchus contortus* (De Jesús-Gabino *et al.*, 2010). Además, los extractos acetónicos de las hojas poseen efectos antihipertensivos y efectos antioxidantes (García-Andrade *et al.*, 2013). En otras ramas de la ciencia, se ha encontrado poseer características anticorrosivas del aluminio (Ramírez-Arteaga *et al.*, 2013). En cuanto al efecto antifúngico de esta especie, no existen estudios. Sin embargo, se han evaluado extractos metanólicos de *Prosopis juliflora* contra hongos importantes que afectan a semillas, *Aspergillus* spp., teniendo mayor efecto contra *A. flavus* (Satish *et al.*, 2007). Mientras que en un estudio de inhibición de *Alternaria alternata*, se obtuvo un mejor resultado con los extractos alcaloides de hojas de la misma especie, inhibiendo en 100 % con una concentración de 1 000 mg L⁻¹ (Raghavendra *et al.*, 2009). Extractos acuosos de *P. juliflora* posee efectos alelopáticos contra *Cymodon dactylon* (Al-Humaid y Warrag, 1998) y antibacteriales, contra bacterias fitopatógenas *Xanthomonas axonopodis* (Raghavendra *et al.*, 2009) y bacterias que afectan a humanos (Ahmad *et al.*, 1986). Las propiedades medicinales de *P. juliflora* se debe a los diferentes compuestos químicos que posee, tales como alcaloides, flavonoides, terpenoides, saponinas y compuestos fenólicos distribuidos en diferentes partes de la planta, e incluso del polen, se han extraído diversos compuestos activos para usos medicinales (Prabha *et al.*, 2014).

1.3.5 *Salvia leucantha*

1.3.5.1 Descripción botánica

Salvia es el género más grande de la familia Lamiaceae con más de 900 especies. Son plantas herbáceas o subarborescentes o arbustos; anuales o bienales o perennes; hierba a menudo aromática, glabra o glandular o con varios indumentos. Tallos erectos o ascendentes; de 20 -175 cm de altura; ramificado o no ramificado de arriba. Hojas pecioladas o sésiles; hojas de varias formas; bordes enteros o dentados o lobulados. Inflorescencias verticales; 2 a 40 flores; transmitidas en racimos o panículas; brácteas y bracteolas normalmente presentes. Cálices bilabiados; de tubular a acampanado; de 10 - 15 o -nervaduras; labios superiores enteros o trilobulados; labios inferiores profundamente monolobulados. 5 sépalos; vellosos; lóbulos pequeños, a menudo espinosos. Corolas bilabiadas; tubulares; labio superior bilabiado o entero, cubierto o recto o arqueado; labios inferiores trilobulados, disperso, lóbulo medio grande, a menudo emarginado. 5 pétalos; azul a púrpura a lavanda o blanco o rojo. 2 estambres; exsertos o incluidos dentro de corolas. Núculas globosas u ovoides; ligeramente triangulares; ligeramente o minuciosamente tuberculado (Burrows y Tyrl, 2013).

1.3.5.2 Importancia

La especie *Salvia leucantha* ha sido evaluada en diversidad de estudios, encontrando efecto de sus aceites esenciales contra mosquitos transmisores de enfermedades para el humano (*Aedes aegypti* y *Anopheles quadrimaculatus*) (Ali *et al.*, 2015). También posee actividad potencial antitumoral (Sridharan *et al.*, 2011). En algunas partes del estado de Guerrero, México, sigue siendo utilizada como planta medicinal para tratar el dolor de estómago y el cansancio (Juárez-

Vázquez *et al.*, 2013). En trabajos previos sobre *Salvia* centrados en fitoquímicos específicos, utilizando técnicas cromatográficas, se resalta la presencia característica de ácido carnósico, carnosol, y flavonoides (Exarchou *et al.*, 2015). Rajendran y Prabha (2016) sintetizaron nanopartículas de plata a partir de extractos acuosos, las cuales mostraron actividad antibacterial contra *Bacillus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* y *Streptococcus pneumonia*.

1.3.6 *Sapindus saponaria*

1.3.6.1 Descripción botánica

Pertenece a la familia Sapindaceae, son árboles pequeños, de 8 a 15 m de altura, hojas alternas generalmente parapinnadas con longitud de 15 a 20 cm. La lámina de la hoja es pequeña y elíptica, lanceolada, de 5 a 12 cm de longitud y 1.5 a 7 cm de anchura, la punta es obtusa a acuminada y la base asimétrica, aguda u obtusa. Posee inflorescencias axilares o terminales en forma de panícula, en las cuales las flores miden 4 mm de diámetro. El fruto rojizo globular es carnoso y arrugado en su superficie, midiendo de 1 a 2 cm de diámetro. Es una drupa y no una berry (como se describe en algunos libros), el cual tiene un endocarpio duro. En su interior presenta semillas negras ricas en grasa (Roth y Lindorf, 2002).

1.3.6.2 Importancia

Los frutos contienen saponinas en su mesocarpio carnoso, el cual macerado con agua produce espuma similar al jabón, y por lo tanto, es usado como sustituto de jabón por nativos de Venezuela y Brasil (Roth y Lindorf, 2002). Esta especie posee efectos insecticidas contra mosca blanca (*Trialeurodes vaporariorum*) (Porrás y López-Avila, 2009), efecto herbicida de extractos hexánico y acetato de etilo contra *Euphorbia heterophylla* y *Echinochloa cruz-galli* (Grisi *et al.*,

2015). En cuanto a propiedades medicinales, posee actividad espermicida, antiulcérico, hepatoprotectivo y antiinflamatorio (Pelegri *et al.*, 2008). Su efecto antibiótico contra *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* (bacterias que causan enfermedades en humanos) se logró utilizando extractos hidrometanólicos extraídos de la parte aérea de la planta (Rashed *et al.*, 2013a), incluso efecto antiviral obtenido utilizando extracto metanólico (Rashed *et al.*, 2013b). También posee efecto muluscocida (Ribeiro *et al.*, 1995). No se ha estudiado su actividad fungicida en fitopatógenos, lo cual hace de esta investigación el primer estudio.

1.4 Metabolitos secundarios con actividad fungicida

1.4.1 Alcaloides

Los alcaloides (compuestos hidrofílicos) se almacenan en la vacuola (Yazdani *et al.*, 2011). Son importantes en las plantas debido a que son utilizados como defensa contra patógenos, principalmente contra hongos como *Colletotrichum* spp., *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Phomopsis* spp. (Oliva *et al.*, 2003). Se ha demostrado el efecto de los diversos tipos de alcaloides para inhibir hongos fitopatógenos, por ejemplo, los compuestos dehidrocoridamina y oxiberberina inhibieron la germinación de conidios de *Helminthosporium*, *Curvularia*, *Alternaria cajani*, *Bipolaris* sp. y *Fusarium udum* (Singh *et al.* 2009), el compuesto entnorsecurinina inhibió a especies de *Curvularia*, *Colletotrichum*, *Alternaria*, *Helminthosporium* y *Fusarium udum* (Goel *et al.*, 2002). En otros estudios se ha encontrado un efecto herbicida, sin embargo, de efecto moderado o de amplio espectro para su uso agroquímico comercial (Iwasa *et al.*, 2000). El mecanismo de acción se atribuye a su habilidad para intercalarse con el ADN (Cowan, 1999).

1.4.2 Flavonoides

Los flavonoides son estructuras fenólicas que contienen un grupo carbonilo, son sustancias fenólicas hidroxiladas que se producen por una unidad C6-C3 unida a un anillo aromático y son almacenados en las vacuolas. Desde que se sabe que los flavonoides se sintetizan por las plantas en respuesta a una infección microbiana, no es sorprendente encontrar que son sustancias antimicrobianas eficaces contra una amplia gama de microorganismos. Su actividad es probablemente debido a su capacidad para formar complejos con proteínas extracelulares y solubles y para formar complejos con las paredes celulares bacterianas (Cowan, 1999).

1.4.3 Terpenoides

El mecanismo de acción de los terpenos no se entiende completamente, pero se especula que implica la disrupción de la membrana por los compuestos lipofílicos (Cowan, 1999). Los terpenoides son secuestrados en los conductos de resina, laticíferos, células de aceite, tricomas, o en la cutícula (Yazdani et al., 2011). Algunos terpenoides, como β -pinena posee efecto contra *Ceratocystis minor*, el cual hace simbiosis con el escarabajo del pino y atacan al mismo, por lo cual, la producción de este compuesto puede ser un importante mecanismo de defensa contra el ataque de estos patógenos (Bridges, 1987). Los terpenoides o terpenos, poseen actividad contra bacterias, hongos, virus y protozoarios (Cowan, 1999).

En el Cuadro 1.1, se resumen algunas clases de metabolitos secundarios y su mecanismo de acción contra microorganismos patógenos.

Cuadro 1.1. Principales clases de compuestos antimicrobianos de las plantas (Cowan, 1999)

Clase	Subclase	Ejemplo	Mecanismo
Fenoles	Fenoles simples	Catecol	Restricción del sustrato
	Ácido fenólicos	Ácido cinámico	
	Quinonas	Hipericina	Se unen a las adhesinas, complejo con la pared celular, inactiva enzimas
	Flavonoides	Crisina	Se unen a las adhesinas
	Flavonas	Abyssinone	Inactiva enzimas
	Taninos	Elagitánicos	Se unen a las proteínas
			Se unen a las adhesinas
			Inhibición enzimática
			Restricción de sustrato
			Complejo con pared celular
	Cumarinas	warfarina	Disrupción de la membrana
			Formación de complejos de iones metálicos
			Interacción con el ADN eucariota (Actividad antiviral)
Terpenoides, aceites esenciales		Capsaicina	Disrupción de la membrana
Alcaloides		Berberina	Se intercalar en la pared celular y/o ADN
		Piperina	

1.5 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE HONGOS

1.5.1 Antecedentes

La biología molecular inició su auge cuando se inventó la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), en 1983 por Kary B. Mullis, con lo cual fue merecedor del premio Nobel en 1993. Así mismo, con la invención de la secuenciación del ADN por Sanger en 1977 (Sanger *et al.*, 1977), se inició un campo en el análisis de secuencias de ADN de diversos organismos. En la actualidad se cuenta con métodos mejorados de extracción de ADN de cualquier organismo, secuenciación rápida, masiva y económica, y una base de datos enorme de secuencias, incluyendo genomas completos (GenBank), así como herramientas informáticas para su análisis. La identificación

precisa de hongos fitopatógenos es esencial en todos los aspectos en fitopatología, desde la investigación fundamental en la biología de los patógenos hasta el control de las enfermedades que causan (McCartney *et al.*, 2003). Los avances en la identificación molecular han permitido el aislamiento de *Colletotrichum fructicola* de una diversidad de hospedantes y lugares en el mundo, incluyendo frutales y ornamentales, además del aguacate (Cuadro 1.2), lo cual sirve para tomar medidas y estrategias para su manejo en campo y postcosecha, debido a su alto potencial patogénico y a la sensibilidad a los fungicidas que presentan diferentes especies del mismo complejo (Hwang *et al.*, 2010; Lima *et al.*, 2015; Ramdial *et al.*, 2015) y virulencia hacia sus hospedantes (Alvarez *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2014).

Cuadro 1.2. Hospedantes y genes utilizados en el análisis multilocus para la identificación de *Colletotrichum fructicola*

Hospedante	Nombre científico	Lugar	Genes utilizados	Referencia
Aguacate	<i>Persea americana</i>	Mexico	ITS	Este estudio
		Colombia	ITS, GAPDH, TUB2	Gañan <i>et al.</i> , 2015
		Australia	ITS, GAPDH, CAL, ACT, CHS-1	Weir <i>et al.</i> , 2012
Café	<i>Coffea arabica</i>	Australia	ITS, TUB2, HIS, TEF1	Guarnaccia <i>et al.</i> , 2016
		Tailandia,	ITS, ACT, CAL, GS, GAPDH,	Prihastuti <i>et al.</i> , 2009
		Laos	TUB2	Phoulivong <i>et al.</i> , 2010
		Tailandia,	ITS, ACT, GAPDH, TUB2	
Manzana	<i>Malus domestica</i>	Laos	ITS, GAPDH, CAL, ACT, CHS-1, GS, SOD2, TUB2	Weir <i>et al.</i> , 2012
		Tailandia		
		Uruguay	ITS, GAPDH, TUB2	Alaniz <i>et al.</i> , 2015
		China	ITS, ACT, TUB2, GAPDH	Fu <i>et al.</i> , 2013; Arzanlou <i>et al.</i> , 2015
		Irán	ITS, TUB, ACT, CAL, HIS	
		Brasil	ITS, GAPDH, CAL, ACT, CHS-1	Weir <i>et al.</i> , 2012
		China	ITS, ACT, CAL, CHS-1, GAPDH, GS, TUB2, SOD2	Jiang <i>et al.</i> , 2014

Pera	<i>Pyrus bretschneideri</i> Rehd.	China	ITS, ACT, CHS-1, GAPDH, TUB2, Apn2/MAT	Zhang <i>et al.</i> , 2014
	<i>Pyrus pyrifolia</i> Nakai	Japón	ITS, GAPDH, CAL, ACT, CHS-1	Weir <i>et al.</i> , 2012
		Irán	ITS, TUB, ACT, CAL, HIS	Arzanlou <i>et al.</i> , 2015
Naranja	<i>Citrus sinensis</i>	Tailandia, Laos	////	Phoulivong <i>et al.</i> , 2012
Papaya	<i>Carica papaya</i>	Tailandia, Laos	////	Phoulivong <i>et al.</i> , 2012
Mango	<i>Mangifera indica</i>	Brasil	ITS, ACT, GAPDH, CAL, GS, TUB2	Lima <i>et al.</i> , 2013.
		Brasil	ITS, CAL, ACT, GAPDH, CHS-1, TUB2, Apn2/MAT IGS	Vieira <i>et al.</i> , 2014
		India	ITS, ACT, CAL, CHS-1, GAPDH, TUB2, ApMAT	Sharma <i>et al.</i> , 2013
		Korea	ITS, ACT, GAPDH, CAL, CHS-1, TUB2	Joa <i>et al.</i> , 2016
		Korea	ITS, ACT, GAPDH	Nam <i>et al.</i> , 2013
Fresa	<i>Fragaria × ananassa</i> Duch.	Canadá	ITS, GAPDH, CAL, ACT, CHS-1	Weir <i>et al.</i> , 2012
		E.E.U.U.	ITS, GAPDH, CAL, ACT, CHS-1, GS, SOD2, TUB2	Weir <i>et al.</i> , 2012
		India	ITS, ACT, CAL, CHS-1, GAPDH, TUB2	Sharma y Shenoy, 2013
Chile	<i>Capsicum annum</i>	Tailandia, Laos	///	Phoulivong <i>et al.</i> , 2012
		Colombia	ITS, ACT, CAL, CHS-1, GAPDH, TUB2	Afanador-Kafuri <i>et al.</i> , 2014
Mora	<i>Rubus glaucus</i> Benth.	Irán	ITS, TUB, ACT, CAL, HIS	Arzanlou <i>et al.</i> , 2015
Gleditsia	<i>Gleditsia caspica</i>	Irán	ITS, TUB, ACT, CAL, HIS	Arzanlou <i>et al.</i> , 2015
Yezgo	<i>Sambucus ebulus</i>	Tailandia, Laos	////	Phoulivong <i>et al.</i> , 2012
Eugenia	<i>Eugenia javanica</i>	China	ITS, ACT, GAPDH, SOD2, CHS-1, TUB2	Li <i>et al.</i> , 2016
	<i>Aucuba japonica</i> var. <i>variegata</i>			
Aucuba	<i>Dombrain</i>	China	ITS, ACT, CAL, GAPDH, GS, TUB2	Niu <i>et al.</i> , 2016
Yute	<i>Corchus capsularis</i>	China	ITS, ACT, GS, GAPDH, CAL, TUB2	Peng <i>et al.</i> , 2013

Uva	<i>Vitis vinifera</i>	Thailand	ITS, ACT, CAL, GAPDH, GS, TUB2	Udayanga <i>et al.</i> , 2013
Pitahaya	<i>Hylocerous undatus</i>	Thailand	ITS, ACT, CAL, GAPDH, GS, TUB2	Udayanga <i>et al.</i> , 2013
	<i>Ziziphus sp.</i>	China	ITS, ACT, CAL, GAPDH, GS, TUB2, ApMAT	Liu <i>et al.</i> , 2015.
Té verde	<i>Camellia sinensis</i>	China	ITS, ACT, CAL, GAPDH, GS, TUB2	Peng <i>et al.</i> , 2012
Bergamota	<i>Citrus bergamia</i>	China	ITS, ACT, CAL, GAPDH, GS, TUB2	Peng <i>et al.</i> , 2012
Pomelo chino	<i>Citrus grandis</i>	Brasil	GAPDH, CAL, CHS-1	Bragança <i>et al.</i> , 2016
Yuca	<i>Manihot esculenta</i>	China	ITS, ACT, CAL, CHS-1, SOD2, TUB2	Wang <i>et al.</i> , 2016
Tabaco	<i>Nicotiana tabacum</i>	Israel	ITS, GAPDH, CAL, ACT, CHS-1, GS, SOD2, TUB2	Weir <i>et al.</i> , 2012
Capitana	<i>Limonium spp.</i>	Nigeria	ITS, GAPDH, CAL, ACT, CHS-1, GS, SOD2, TUB2	Weir <i>et al.</i> , 2012
Ñame de agua	<i>Dioscorea alata</i>	Panamá	ITS, GAPDH, CAL, ACT, CHS-1, GS, SOD2, TUB2	Weir <i>et al.</i> , 2012
Cacao	<i>Theobroma cacao</i>	Alemania	ITS, GAPDH, CAL, ACT, CHS-1, GS, SOD2, TUB2	Weir <i>et al.</i> , 2012
Ficus	<i>Ficus edulis</i>	Panamá	ITS, GAPDH, CAL, ACT, CHS-1, GS, SOD2, TUB2	Weir <i>et al.</i> , 2012
Cedro macho	<i>Tetragastris panamensis</i>			

ITS=Espacio transcrito interno, ACT=actina, CAL=calmodulina, GAPDH=gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa, GS=glutamina sintasa, CHS-1=quitina sintasa, TUB2=β-tubulina, SOD=superóxido dismutasa, TEF1= factor de elongación.

1.5.2 Técnicas de identificación

Para la identificación molecular de cualquier organismo, se siguen cuatro pasos básicos: i).- extracción de ADN, ii).- amplificación por PCR, iii).-secuenciación, y iv).- análisis bioinformático.

i).- **Extracción de ADN.** Existe diversidad de protocolos para el proceso de la extracción de ADN, los cuales varían según el tipo de organismo (bacterias, hongos, plantas, animales, etc.). En hongos, se han reportado protocolos desde 1992 (Möller *et al.*, 1992) hasta la actualidad, con kits comerciales elaborados por empresas especializadas en biología molecular (QIAGEN,

SIGMA ALDRICH, ZYMO RESEARCH, etc.). Este paso, consiste básicamente en lisar las células de los tejidos del organismo y realizar la limpieza de la suspensión, es decir, separar y remover del ADN, las proteínas y moléculas producto de la lisis celular (Wang *et al.*, 2011).

ii).- **PCR**. Este paso consiste en amplificar copias de ADN seleccionado para el estudio, el cual se lleva a cabo mediante ciclos de desnaturalización de la doble hebra de ADN, copiado de la secuencias utilizando iniciadores específicos y la polimerasa (*Taq* polimerasa) a temperaturas optimizadas para que se lleva a cabo el proceso. Estos ciclos dan como resultado la acumulación exponencial de un fragmento específico de ADN, aproximadamente 2^n , donde n es el número de ciclos (Saiki *et al.*, 1987).

iii).- **Secuenciación**. En la actualidad el método más utilizado para este proceso es el método de secuenciación de Sanger con modificaciones, la cual consiste en añadir un colorante a los dideoxinucleótidos que generan una emisión fluorescente diferente detectada por el secuenciador automático, al momento de desplazarse por capilaridad (Prober *et al.*, 1987). Aunque en la actualidad sigue utilizándose este método para secuenciar genomas completos, sigue siendo costoso, sin embargo, como resultado de los avances, los secuenciadores pueden manejar 96 muestras al mismo tiempo, abaratando los procesos en tiempo y costo (Admas, 2008). Hoy en día, uno de los métodos de secuenciación es la pirosecuenciación, la cual es una técnica no fluorescente que mide el incremento de pirofosfato, el cual es proporcionalmente convertido en luz visible por una serie de reacciones enzimáticas (Metzker, 2005).

iv).- **Análisis bioinformático**. Una vez teniendo las secuencias de ADN, el siguiente paso es analizarlas; para ello, es necesario programas informáticos dotados de características y algoritmos para realizar diversos cálculos, desde detectar diferencias entre secuencias hasta la

reconstrucción de árboles filogenéticos. La base de datos de GenBank, EMBL (European Molecular Biology Laboratory) y DNA Databank de Japón, sirven como un modelo para compartir información de secuencias de ADN, de las cuales la comunidad científica puede adquirir, aunque algunas veces poseen errores al momento de someterlas (Noor *et al.*, 2006). Las bases de datos como el GenBank (NCBI) crecen exponencialmente; en 1990 se encontraban tan solo 39 533 secuencias, mientras que diez años después se incrementó a más de 10 millones, y dos años después se duplicó a más de 22 millones de secuencias depositadas (Higgs y Attwood, 2005). Actualmente existen más de 194 millones de secuencias depositadas en el GenBank (NCBI, 2016).

Para la identificación de los fitopatógenos, primeramente se realiza un BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), el cual busca secuencias de ADN y proteínas (Altschul *et al.*, 1997), posteriormente las secuencias pueden editarse y alinearse en diversidad de software, tal es el caso de BioEdit (Hall, 1999) o MEGA (Tamura *et al.*, 2013). Por último, se construye el árbol filogenético con diversos métodos, siendo los más utilizados el de máxima parsimonia, máxima verosimilitud, e inferencia bayesiana, los cuales agruparán en un mismo clado las secuencias que se están evaluando con secuencias tipo de referencia.

CAPÍTULO II. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LA ANTRACNOSIS (*Colletotrichum fructicola*) EN FRUTOS DE AGUACATE

1.1 INTRODUCCIÓN

El cultivo de aguacate (*Persea americana* Miller) es atacado por varias enfermedades, dentro de las cuales el género *Colletotrichum* resulta ser el hongo más común. *Colletotrichum* spp. se caracteriza por causar manchas de antracnosis, tizones en las partes aéreas de la planta y pudriciones del fruto en poscosecha. Es particularmente peligroso como patógeno poscosecha debido a las infecciones latentes, que se inician antes de la cosecha, pero no se activan hasta después de que el fruto ha sido almacenado (Dean *et al.*, 2012). Sin embargo, no es una sola especie la causante de la enfermedad en México, además de *Colletotrichum gloeosporioides* se han reportado a *C. acutatum*, *C. boninense* (Silva-Rojas y Ávila-Quezada, 2011), *C. godetiae* (Hernández-Lauzardo *et al.* 2015) y *C. karstii* (Velázquez-del Valle *et al.*, 2016). En el caso de *C. fructicola* solamente se ha reportado en Australia (Weir *et al.*, 2012) y Colombia (Gañán *et al.*, 2015) causando antracnosis en frutos de aguacate, mientras que en Italia ha sido reportado como causante de la pudrición del pedúnculo (Guarnaccia *et al.*, 2016). Es fundamental la diferenciación entre las especies de *Colletotrichum* para entender la epidemiología de la enfermedad y desarrollar e implementar estrategias de control efectivas (Freeman *et al.*, 1998), debido a que puede existir variabilidad patogénica o respuesta al ambiente en diferentes especies. Por ejemplo, Everett (2003) menciona que el almacenamiento en frío de frutos de aguacate, disminuye la incidencia de pudriciones causadas por *C. gloeosporioides*, pero no las causadas por *C. acutatum*, debido a la diferente sensibilidad de las esporas al frío. Sin embargo,

la dificultad para diferenciar las especies de *C. gloeosporioides*, ha requerido utilizar la amplificación y secuenciación de marcadores moleculares de ADN, gracias a lo cual se ha descubierto un complejo de 22 especies (incluida *C. fruticola*) más una subespecie, conformando el complejo de *C. gloeosporioides* (Weir *et al.*, 2012). El uso de herramientas moleculares ha ayudado a elucidar la estructura fenotípica y genética dentro de las especies y la complejidad de las poblaciones de hongos de importancia en la protección de cultivos (Capote *et al.*, 2012), y es un soporte en la toma de decisiones para realizar un diagnóstico preciso (McCartney *et al.*, 2003).

1.2 OBJETIVOS

- ❖ Identificar y caracterizar morfológicamente el agente causal de la antracnosis en frutos de aguacate *Hass* provenientes de Molango, Hidalgo.
- ❖ Realizar el análisis filogenético de los aislamientos para complementar la caracterización morfológica del hongo.

1.3 HIPÓTESIS

- ❖ El hongo causante de la antracnosis en frutos de aguacate cv. *Hass* corresponde a una especie de *Colletotrichum spp.*
- ❖ El análisis filogenético es indispensable y suficiente para la caracterización del hongo causante de la antracnosis en frutos de aguacate cv. *Hass*.

1.4 MATERIALES Y MÉTODOS

1.4.1 Área de muestreo

Se realizaron muestreos de frutos de aguacate con presencia de daños por antracnosis en el municipio de Molango de Escamilla, Hidalgo. El muestreo se realizó en el mes de septiembre del 2015, el material colectado se llevó al Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Parasitología Agrícola en la Universidad Autónoma Chapingo para su preparación y análisis.

1.4.2 Aislamiento y purificación

El hongo se aisló de frutos con presencia de daño por antracnosis tomando fragmentos de tejido sano y enfermo de una superficie aproximada de 1 cm². El tejido se desinfectó con hipoclorito de sodio al 1.5 % por 2 min, y se enjuagó en agua destilada dos veces (2 min en cada ocasión). Los tejidos desinfectados se colocaron en cajas Petri con medio de cultivo Papa-Destroxa-Agar (PDA) y se incubaron por 15 d a temperatura ambiente (Rodríguez *et al.*, 2013).

Para establecer una colección confiable es necesario partir de aislamientos monospóricos que garanticen la autenticidad y pureza de los mismos y de los datos que se obtengan. El aislamiento monospórico se inició preparando una solución de Tween 80 al 0.1 %, la cual se esterilizó en la autoclave a 15 libras de presión por 15 min. Se preparó una solución de esporas colocando 1 mL de la solución de Tween al 1 % en un tubo de ensayo y se le agregó una porción de PDA conteniendo al patógeno; se agitó ligeramente para separar todas las esporas, y se contó el número de ellas utilizando una cámara de Neubauer bajo el microscopio óptico a 40X. Se prepararon las diluciones necesarias hasta obtener de 50 a 100 esporas mL⁻¹, se sembraron 100 µL de la solución en una placa con medio de cultivo PDA y se distribuyó con un triángulo de vidrio; se incubó por dos d y se tomó un corte de medio de cultivo conteniendo un solo conidio

para ser sembrado nuevamente en placas con PDA, el cual se incubó por espacio de 15 d a 28 °C.

1.4.3 Prueba de patogenicidad

La patogenicidad del aislamiento obtenido se comprobó en frutos de aguacate con madurez fisiológica, siguiendo el método propuesto por Gañán *et al.*, (2015) con algunas modificaciones; se lavaron con agua corriente 10 frutos de aguacate sanos var. *Hass* y se esterilizaron de la superficie mediante inmersión en etanol (3 min), hipoclorito de sodio al 1 % (cinco min), y agua destilada estéril (tres veces durante dos min cada una), secándose al aire libre en toalla de papel estéril. Se les realizó una punción con aguja estéril y se colocaron 30 µL de una suspensión de esporas 1×10^6 conidios mL⁻¹, a 10 frutos usados como control se les inoculó simplemente agua destilada estéril. Los frutos inoculados se colocaron en una cámara húmeda en condiciones estériles a temperatura ambiente. Después de 11 d de la inoculación, se observaron los síntomas de la enfermedad y se procedió al reaislamiento del patógeno obteniéndose nueve cepas las cuales fueron identificadas molecularmente.

1.4.4 Identificación morfológica

De un cultivo de cinco d se cortó del borde un disco de 0.4 cm de diámetro de micelio en crecimiento activo y se colocó en papa-dextrosa-agar (PDA). Las cajas Petri se incubaron a 27 °C en la oscuridad por cinco d, se utilizaron tres repeticiones. Después de siete d, se midió el tamaño conidial y la forma de 50 conidios evaluando el ancho y largo de éstos (Cai *et al.*, 2009). A los resultados obtenidos se les calculó la media y la desviación estándar del largo y ancho de los conidios, usando el software SAS (SAS, 2014).

Se obtuvieron los apresorios usando la técnica de cultivo en portaobjetos, colocando 1 cm² de *Colletotrichum* creciendo en PDA en una caja Petri vacía y poniendo un cubreobjetos estéril sobre el agar. Después de 15 d, se estudió el tamaño y forma de los apresorios formados en el cubreobjetos (Johnston y Jones, 1997; Cai *et al.*, 2009)

1.4.5 Identificación molecular

1.4.5.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN se llevó a cabo de acuerdo a CTAB 2 % (Doyle y Doyle, 1990) (Anexo 1).

1.4.5.2 Amplificación por PCR y secuenciación

La PCR para los aislamientos se llevó a cabo utilizando los iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990), los cuales amplifican los espacios internos transcritos y el gen 5.8S del ADN ribosomal (región ITS). La mezcla de reactivos en un volumen final consistió en 25 µL, cuyos componentes fueron: amortiguador de reacción 1X, MgCl₂ 2 mM, dNTP's 200 nM de cada uno, 20 pmoles de cada oligonucleótido y 1 unidad de Taq DNA polimerasa (PromegaMR). El programa térmico consistió en mantener una temperatura de 94 °C durante 2 min, seguido de 35 ciclos a 94-55-72 °C durante 20-25-50 s, respectivamente, y una extensión final de 4 min a 72 °C. Los fragmentos amplificados por PCR fueron analizados en un secuenciador ABI PRISM® 3700 Genetic Analyzer.

1.4.5.3 Construcción del árbol filogenético

Las secuencias consenso se editaron y ensamblaron con la opción CAP (Contig Assembly Program) del Software BioEdit 7.2.5 (Tom Hall Ibis Biosciences) (Hall, 2004). Para el análisis evolutivo, todas las secuencias consenso fueron alineadas con el ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) incluido en el software MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2015). Las reconstrucciones filogenéticas se realizaron para los datos del ITS1-5.8S-ITS2 con el método de máxima parsimonia, utilizando el algoritmo Subtree-Pruning-Regrafting, opción de búsqueda (nivel=1) con el árbol inicial por adición al azar (10 repeticiones) y los espacios faltantes fueron considerados como deleciones completas. Para calcular los valores de confianza de los clados del árbol, se realizó una prueba de bootstrap con 1000 repeticiones (Felsenstein, 1985). Se utilizó la cepa KF-2014 *Acremonium* sp. (Número de accesoión: KM225291) como especie fuera de grupo.

1.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.5.1 Prueba de patogenicidad

Todos los frutos inoculados mostraron los síntomas característicos de la antracnosis, en el mesocarpio se observó una pudrición café oscura. Los frutos control no presentaron ningún síntoma (Figura 2.1).

1.5.2 Identificación morfológica

El crecimiento de la colonia en medio PDA fue de una coloración verde grisáceo, con los bordes blanquecinos. Los conidios son oblongos con los bordes redondeados, con una longitud promedio de 15.54 μm y 6.95 μm de ancho. Los apresorios ovoides, cafés y algunos irregulares,

creciendo en cubreobjetos de vidrio (Figura 2.2), lo cual coincide con lo descrito por Weir *et al.* (2012). No se observaron acérvulos, ascas ni setas (*Glomerella* sp.).



Figura 2.1. Síntomas de antracnosis en el mesocarpio (A, B), exocarpio (C, E), frutos control (D) y conidios (F), después de 11 ddi.

El tamaño de los conidios reportado por primera vez varió de 9.7-14.0 y 3.0-4.3 μ m (Prihastuti *et al.*, 2009); sin embargo, se ha encontrado que diferentes aislamientos de *C. fruticola* varía en tamaño de conidios. Zhang *et al.* (2015) encontró el tamaño de largo y ancho de 11.8-14.1 y

4.3-6 μm , dependiendo de las características culturales de los aislamientos en medio PDA, obtenidos de pera (*Pyrus pyriolia*). Sharma y Shenoy (2014) reportaron variaciones de 9.8-17.7 y 4.5-5.9 μm de largo y ancho, respectivamente. Por otra parte, las características morfológicas dependerán del medio de cultivo utilizado, el pH y la temperatura a la que se incuben los aislamientos (Jiang *et al.*, 2014)

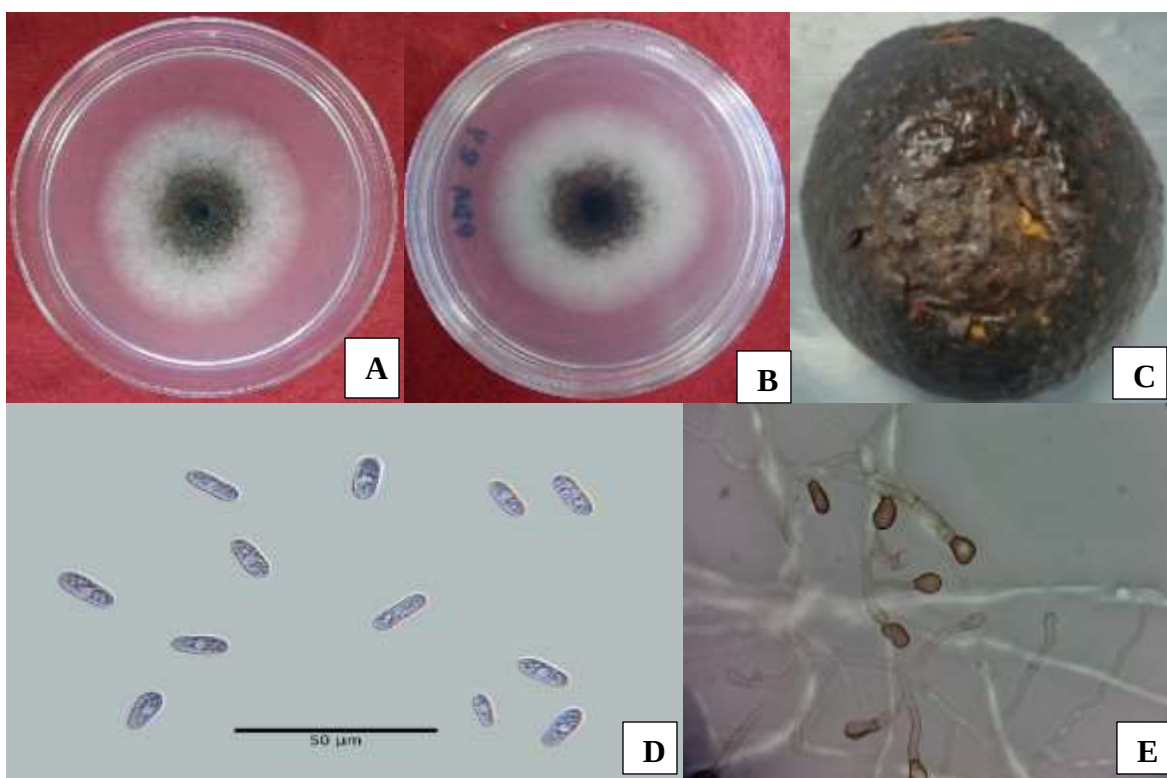


Figura 2.2. Morfología del hongo causal de la antracnosis en medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA) a 25 °C después de cinco d de incubación (A reverso y B anverso), en frutos de aguacate (C), conidios maduros (D) y apesorios producidos mediante cultivo en portaobjetos (E).

1.5.3 Identificación molecular

Con base a la reconstrucción filogenética de la región ITS, los nueve aislamientos pertenecieron a la especie *Colletotrichum fructicola*, con una confiabilidad del nodo de 97 % (Figura 2.3). La

región ITS separó perfectamente las especies de los clados *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* y *C. boninense*. Hasta la fecha, en el mundo solamente existen dos reportes de *C. gloeosporioides* sensu stricto (s. str.) como agente causal de la antracnosis y pudrición de pedúnculo en aguacate (Akgül *et al.*, 2016; Guarnaccia *et al.*, 2016), identificado con base a los genes ACT y TUB2 utilizando solamente el BLAST (NCBI). La ausencia de esta especie como agente causal de la antracnosis puede deberse a que han sido mal identificadas, debido a que es un complejo de especies que pueden diferenciarse solo mediante al análisis filogenético multilocus (Weir *et al.*, 2012). La mayoría de las investigaciones que reportan a *C. gloeosporioides* como causante de la antracnosis en aguacate, sin embargo, ha habido una incorrecta identificación, debido a que se basan solamente en la comparación del ITS, la cual no separa las especies del complejo (Silva-Rojas y Ávila-Quezada, 2011; Campos-Martínez *et al.*, 2016). Esto sucede no solo para el hospedante aguacate, sino también en otros hospedantes. Phoulivong *et al.* (2010) encontró que ningún aislamiento en ocho cultivos diferentes con presencia de antracnosis, se identificó como *C. gloeosporioides* s.str., sino como diversas especies pertenecientes al complejo. Sin embargo, se debe tener mucho cuidado al definir nuevas especies, especialmente aquellas que se encuentran en etapas tempranas de divergencia evolutiva, debido a que puede ser difícil comprobar usando métodos de análisis filogenético multilocus por la diferencia sustancial de las historias evolutivas de los genes (Stewart *et al.*, 2014). Esto ha sucedido con la especie *C. siamense* (perteneciente al complejo *C. gloeosporioides*), que se propuso como un complejo de especies con base en el análisis filogenético multilocus o utilizando un solo locus (*ApMat*) (Sharma *et al.*, 2015). Posteriormente, utilizando múltiples enfoques, como el análisis basado en la Concordancia Genealógica Filogenética en el Reconocimiento de Especies y métodos

coalescentes (Mixto Generalizado de Yule), no soportan el reconocimiento de ningún linaje evolutivo independiente dentro de *C. siamense* para definir distintas especies. Además, esta conclusión fue reforzada por la detección de recombinación genética, fertilidad cruzada y la comparación de características ecológicas y morfológicas (Liu *et al.*, 2016).

C. fructicola fue identificado y descrito por primera vez por Prihastuti *et al.* (2009) mediante el análisis filogenético multilocus (ITS, actina, β -tubulina, calmodulina, glutamina sintetasa y gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa). Las colonias en PDA primero son blancas, llegando a ser con el tiempo, gris a gris oscuro en el centro, en el reverso círculo negro alrededor del margen de crecimiento, y una tasa de crecimiento de 10.58-11.5 mm día⁻¹; esclerocios y acérvulos ausentes. Los conidios miden de 9.7-14 $\times$ 3-4.3 μ m, unicelulares, hialinos, de paredes lisas, cilíndricos con los bordes ligeramente obtusos, algunas veces oblongos; poseen en el centro una gran masa de lípidos almacenados (parecido a gotas de aceites dentro de la célula) rodeada por otras más de tamaño pequeño. Los apresorios miden de 4.3-9.7 $\times$ 3.7-7.3 μ m producidos mediante cultivo en portaobjetos, la mayoría formados a partir del micelio, café a café oscuro, ovoides, y de forma ligeramente irregular a irregular (Prihastuti *et al.*, 2009).

1.6 CONCLUSIONES

El agente causal de la antracnosis del aguacate cv. *Hass* provenientes de Molango de Escamilla, Hidalgo, fue *Colletotrichum fructicola*, siendo este el primer reporte en México del hongo en frutos de aguacate. Los síntomas en los frutos en cámaras húmedas en las pruebas de patogenicidad, fueron observados a los 11 d después de la inoculación (ddi), mientras que la severidad del 100 % se presentó a los 14 ddi. Presentó características morfológicas similares

con las reportadas previamente en diversos estudios. El análisis filogenético con la región ITS, separó con alta confiabilidad, esta especie de las especies *C. gloeosporioides* s. str. (97 % bootstrap) y *C. queenslandicum* (72 % bootstrap), pertenecientes al mismo complejo.

Se han aplicado las características morfológicas en medio agar para la diferenciación de especies de *Colletotrichum*, ya que la morfología de los conidios entre dos especies puede ser similar, pero las características de la colonia en medio de cultivo son diferentes. Combinar las técnicas de identificación morfológicas con técnicas de identificación molecular, como en el presente estudio, garantiza una identificación más confiable del patógeno.

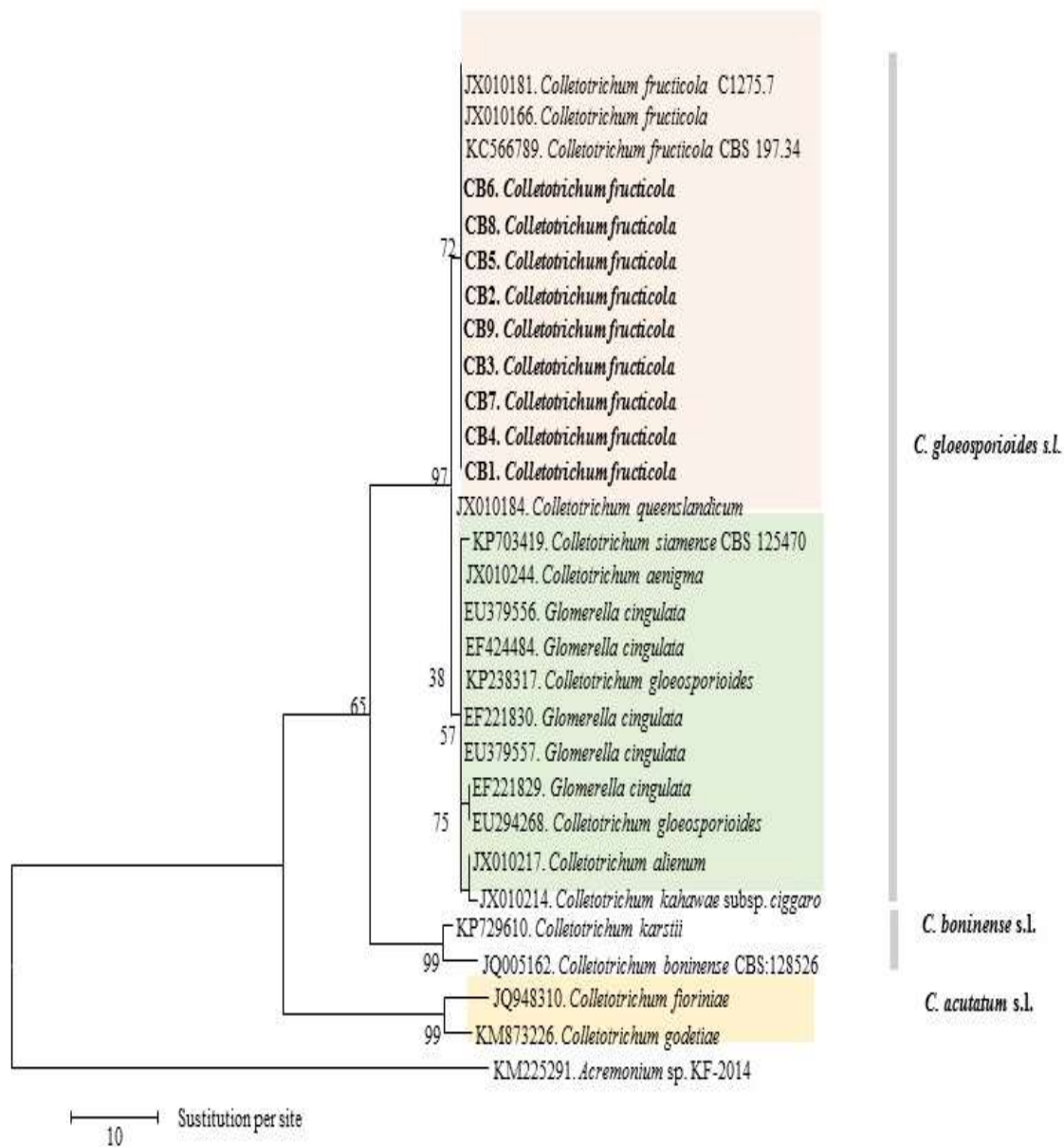


Figura 2.3. Árbol filogenético de la región ITS del ADNr, construido con el método de máxima parsimonia, utilizando el algoritmo Subtree Pruning Regrafting. La confiabilidad de los nodos se generó con 1000 repeticiones bootstrap.

CAPITULO III. ENSAYOS DE ACTIVIDAD FUNGICIDA DE EXTRACTOS VEGETALES CONTRA *Colletotrichum fructicola*

1.1 INTRODUCCIÓN

En el mundo la agricultura ha sufrido una baja en la producción de alimentos debido a enfermedades en pre y poscosecha causadas por hongos, bacterias, virus y otros agentes (Singh *et al.*, 2009). Las acciones para el control de estas enfermedades han sido el uso de fungicidas sintéticos de manera indiscriminada causando resistencia de los microorganismos, contaminación de la atmósfera y efectos perjudiciales en la salud de los seres humanos debido a los residuos tóxicos que se encuentran en los alimentos de consumo humano (Jasso *et al.*, 2011). Así mismo, la preferencia de los consumidores por productos frescos orgánicos se ha incrementado en países desarrollados, y al ser el aguacate un producto de exportación surge la necesidad de buscar alternativas de control más amigables con el ambiente y con la salud humana. El uso de extractos vegetales para el control de enfermedades tiene como antecedentes el papel fundamental que las plantas han desempeñado en la vida del hombre, quien las ha utilizado para suplir necesidades básicas como alimento, medicina, vivienda y vestido, incluso en actos rituales (Celis, *et al.*, 2008). Es bien sabido que las plantas producen componentes antimicrobiales que pueden estar presentes en diferentes partes de la planta por ejemplo, semillas, hojas, flores, etc. (Bautista-Baños *et al.*, 2013) y que pueden ser aprovechadas como biocontroladores de enfermedades causadas por hongos.

En México existe una gran diversidad de especies botánicas que se emplean comúnmente para el control de enfermedades en humanos; sin embargo, su uso en el control de fitopatógenos es

escaso (Barrera y Bautista, 2008). Los estudios realizados para el control del género *Colletotrichum* han demostrado el potencial fungicida que tienen diferentes plantas de las diversas regiones de México. Se ha reportado que los extractos de ajo (*Allium sativum*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*), y clavo (*Syzygium aromaticum*) mostraron efecto fungicida contra *C. gloeosporioides* (Barrera-Necha, *et al.*, 2008, Landero- Valenzuela, *et al.*, 2013;). Así mismo, Jasso, *et al.* (2011) reportó el primer caso de la actividad fungicida de extractos hexánicos y etanólicos de orégano (*L. graveolens*), Agave lechuguilla (*A. lechuguilla*), Yucca carnerosana (*Y. carnerosana*) y Yucca filifera (*Y. filifera*) contra *R. stolonifer*, *C. gloeosporioides* y *P. digitatum*.

1.2 OBJETIVOS

- ❖ Evaluar la actividad fungicida de extractos metanólicos de *Phytolacca icosandra* L., *Prosopis laevigata* (Willd), *Salvia leucantha* Cav., *Cestrum dumetorum* Schlecht, y *Sapindus saponaria* L., así como de los extractos hexánicos de *P. laevigata* (Willd), *S. leucantha* Cav. y *C. dumetorum* contra *Colletotrichum fructicola*
- ❖ Evaluar bajas concentraciones del extracto metanólico de *P. laevigata* (Willd) contra *C. fructicola*
- ❖ Realizar el análisis fitoquímico cualitativo de los extractos metanólicos de *P. icosandra* L., *P. laevigata* (Willd), *S. leucantha* Cav., *C. dumetorum* Schlecht, y *S. saponaria* L

1.3 HIPÓTESIS

- ❖ Los extractos metanólicos y hexánicos de las especies estudiadas poseen actividad antifúngica diferente contra el crecimiento micelial de *C. fructicola*

1.4 MATERIALES Y MÉTODOS

1.4.1 Recolección de material vegetal

1.4.2 Identificación taxonómica

Para la identificación taxonómica del material vegetal se solicitó el apoyo del M.C. Antonio Cortés Jiménez responsable del Herbario del Departamento de Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo. Para la identificación taxonómica se prepararon dos muestras de cada especie.

1.4.3 Obtención de extractos vegetales

Las especies vegetales utilizadas para la extracción se colectaron de distintos lugares, en el Cuadro 3.1 se presenta la lista de las cinco especies estudiadas, la familia, así como el tejido empleado. Las muestras se secaron en una estufa a 40 °C por 48 h. Se realizó la molienda del material utilizando un molino Thomas Wiley modelo 4 Arthur H. Thomas Company Philadelphia, P.A. U.S.A. hasta obtener una harina, la cual se almacenó en bolsas de papel estraza hasta su análisis. La obtención de los extractos se llevó a cabo en un equipo Soxhlet, colocando en la parte media del cuerpo extractor del sistema cartuchos de papel filtro con 100 g de material vegetal molido, usando hexano como disolvente y en reflujo por 36 h. Transcurrido este tiempo, los cartuchos se secaron al aire libre para colocarlos nuevamente en el equipo Soxhlet usando metanol como disolvente y haciendo la extracción por 36 h. Los extractos metanólicos y hexánicos se concentraron por evaporación del disolvente a presión reducida en un rotaevaporador Büchi (Delgado *et al.*, 2012).

Cuadro 3.1. Familia, lugar de colecta y tipo de tejido empleado en la evaluación de actividad antifúngica contra *C. fructicola*.

Nombre de la planta	Familia	Lugar de colecta	Tejido
<i>Cestrum dumetorum</i>	<i>Solanaceae</i>	Tlalchinol, Hidalgo	H*
<i>Phytolacca icosandra</i>	<i>Phytolaceae</i>	Texcoco, Edo. De México	H
<i>Prosopis laevigata</i>	<i>Leguminosae</i>	Tepalcingo, Morelos	H
<i>Salvia leucantha</i>	<i>Lamiaceae</i>	Cuautla, Morelos	H
<i>Sapindus saponaria</i>	<i>Sapindaceae</i>	Tepalcingo, Morelos	F*

*: H: hoja, F: fruto.

1.4.4 Evaluación *in vitro*

1.4.4.1 Método de difusión de discos

Para determinar si los extractos metanólicos de *C. dumetorum*, *P. icosandra*, *P. laevigata*, *S. leucantha* y *S. saponaria* y los extractos hexánicos de *P. laevigata*, *S. leucantha* y *C. dumetorum* presentaban efecto fungicida contra *C. fructicola*, se estableció un ensayo utilizando cuatro concentraciones distintas 10, 25, 50 y 75 % para los extractos metanólicos y 5, 10, 15 y 20 % para los extractos hexánicos. Se utilizó el método de difusión de discos descrito por Al-Reza *et al.* (2010), en cajas Petri (9 cm de diámetro) con 20 mL de Papa-Dextrosa-Agar (PDA) solidificado se colocaron discos de papel Whatman No. 1 estériles, de 6 mm de diámetro, equidistantes en forma cuadrangular y cerca del borde de la caja (Figura 3.1), previamente sumergidos en los extractos metanólicos y hexánicos de cada especie a las concentraciones

respectivas. Se colocó en el centro de la caja un disco de agar con inóculo de *C. fructicola* (4 mm de diámetro) que se tomó de un cultivo en crecimiento activo con 7 ddi. Las cajas Petri se sellaron con parafilm y se incubaron a 25 °C durante 11 d para el caso de extractos metanólicos y 5 d para los extractos hexánicos, es decir, hasta que el crecimiento cubrió la superficie en las cajas control. Como control negativo se utilizaron placas sin extracto, los tratamientos se compararon con un fungicida comercial Tecto® (Tiabendazol 1 gL⁻¹) y un fungicida biológico Solba (*Bacillus spp* 1 gL⁻¹). Se midió el crecimiento radial del hongo cuando la caja Petri sin tratamiento cubrió la superficie completa.

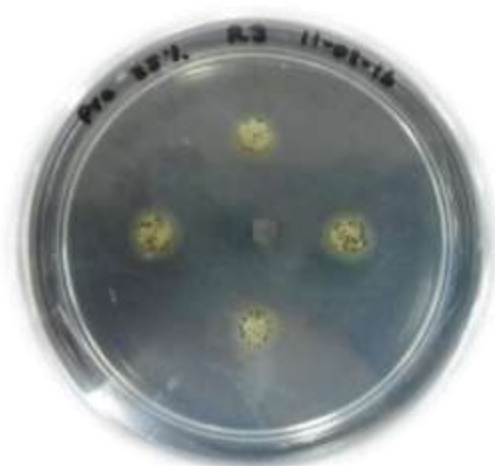


Figura 3.1. Representación gráfica del acomodo de los discos de papel Whatman No. 1 estériles, de 6 mm de diámetro impregnados con extracto dentro de cada caja Petri.

1.4.5. Ensayo de inhibición de *P. laevigata*

1.4.5.1. Método de envenenamiento del medio

Una vez que se encontró por el método de difusión de discos que el extracto metanólico de *P. laevigata* presentó el mayor grado de inhibición del crecimiento micelial de *C. fructicola*, el extracto se evaluó a bajas concentraciones para observar si aún presentaba efecto inhibitorio.

Para ello se utilizó el método de envenenamiento del medio con algunas modificaciones (Jasso *et al.*, 2011; Bosquez *et al.*, 2010), se adicionó a una caja Petri, que contenía medio de cultivo PDA solidificado, 700 µL del extracto a seis concentraciones distintas 1, 5, 10, 15, 20 y 25 % y se dejó reposar por una h. Posteriormente se inoculó cada caja con un disco de PDA (4 mm) conteniendo al patógeno *C. fructicola*. Las cajas se incubaron a 28 °C midiendo el crecimiento micelial de la colonia con un vernier cuando la caja Petri sin tratamiento cubrió por completo la superficie del medio (7 d). El extracto metanólico de *P. laevigata* se comparó con el fungicida comercial Tecto® (Tiabendazol 1 gL⁻¹) y un fungicida biológico Solba (*Bacillus spp* 1 gL⁻¹).

1.4.6. Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones para el método por difusión de discos y tres repeticiones para el método de envenenamiento del medio, la unidad experimental estuvo formada por una caja Petri de 9 cm de diámetro con medio PDA. Se realizó el análisis de varianza y comparación múltiple de medias con el método de Tukey al 5 % de significancia, utilizando el paquete estadístico SAS (SAS, 2014).

1.4.7. Variables evaluadas

Se midió el crecimiento radial del hongo cuando la caja Petri sin tratamiento cubrió la superficie completa, posteriormente se calcularon los porcentajes de inhibición con la siguiente ecuación (Jing *et al.*, 2014; Punrawich *et al.*, 2010):

$$PI = \left[\frac{CMC - CMT}{CMC} \right] (100)$$

Donde PI = % de inhibición, CMC=crecimiento micelial en el control y CMT= crecimiento micelial en el tratamiento.

1.4.8 Análisis fitoquímico para determinación de metabolitos secundarios

1.4.8.1 Flavonoides

Para la identificación cualitativa de flavonoides en los extractos metanólicos de *Cestrum dumetorum*, *Phytolacca icosandra*, *Prosopis laevigata*, *Salvia leucantha*, *Sapindus saponaria* se colocó una muestra de cada extracto en una placa cromatográfica de gel de sílice 60 F254 (Merck) con ayuda de un capilar, la placa se colocó en una cámara de elución saturada con una mezcla de butanol: ácido acético: agua (40:10:50 v/v) por un tiempo suficiente de tal manera que el disolvente alcanzara el frente del mismo. La placa se sacó y observó a luz visible, posteriormente se asperjó con reactivo NP (2-aminoethildifenilborinato) al 0.3 % en metanol y después se asperjó con PEG (polietilenglicol) 4000 al 5 % p/v en metanol para acentuar la coloración de las manchas. La placa se expuso a luz ultravioleta a una longitud de 365 nm y se observaron las coloraciones amarillas-naranjas y verde-amarillas indicativas de la presencia de flavonoides (Wagner y Bladt, 1996).

1.4.8.2 Terpenoides

Para la determinación de terpenoides se utilizó una placa de sílica gel 60 F254 (Merck), a la cual se le colocó con ayuda de un capilar una muestra de cada extracto metanólico de las especies vegetales estudiadas, la placa se introdujo en una cámara de elución utilizando como eluyente tolueno-acetato de etilo en proporción 93:7, respectivamente, se reveló con los agentes cromogénicos de una mezcla de vainillina 1 % en etanol, se dejó secar y se asperjó con una solución etanólica de H_2SO_4 al 10 % v/v, finalmente se colocó en una estufa a 110 °C durante

cinco min para su observación. Las coloraciones púrpuras indicaron la presencia de terpenoides en las muestras (Wagner y Bladt, 1996).

1.4.8.3 Alcaloides

Se aplicó una muestra de cada extracto metanólico sobre una placa de cromatografía en capa fina de gel de sílice, la placa se introdujo en una cámara de elución saturada con una mezcla de metanol: diclorometano (8:2 v/v), una vez que el disolvente alcanzó el frente, se sacó la placa y se dejó secar al aire libre, se asperjó con reactivo de Dragendorff, y se colocó en una parrilla eléctrica a baja temperatura hasta que la aparición de manchas color marrón indicaron la presencia de alcaloides en las muestras (Wagner y Bladt, 1996).

1.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.5.1 Identificación taxonómica del material vegetal

La identificación taxonómica de las especies utilizadas en el presente estudio determinó que las plantas colectadas fueron, *Phytolacca icosandra* L., *Prosopis laevigata* (Willd), *Salvia leucantha* Cav., *Cestrum dumetorum* Schlecht, *Sapindus saponaria* (Figura 3.2).

1.5.2 Obtención de extractos vegetales

Los mejores rendimientos se obtuvieron de los extractos metanólicos, *Sapindus saponaria* sobresalió con un rendimiento de 80.5 %, *Salvia leucantha* con 32.58 %, *Phytolacca icosandra* 23.72 %, *Prosopis laevigata* 18.88 % y finalmente *Cestrum dumetorum* con 11.06 %; mientras que los extractos hexánicos tuvieron rendimientos muy bajos (< de 4 %).

Los rendimientos de los extractos dependen del método de extracción, origen geográfico de la planta, parte de la planta y disolventes orgánicos empleados. Thakur *et al.* (2014) obtuvieron rendimientos de 25.5 % de *Prosopis juliflora* empleando el método de extracción por soxhlet en metanol como disolvente, en contraste con los resultados obtenidos en este estudio bajo las mismas condiciones de extracción de *P. laevigata* (18.88 %), lo cual demuestra las variaciones en rendimientos de acuerdo a la especie.

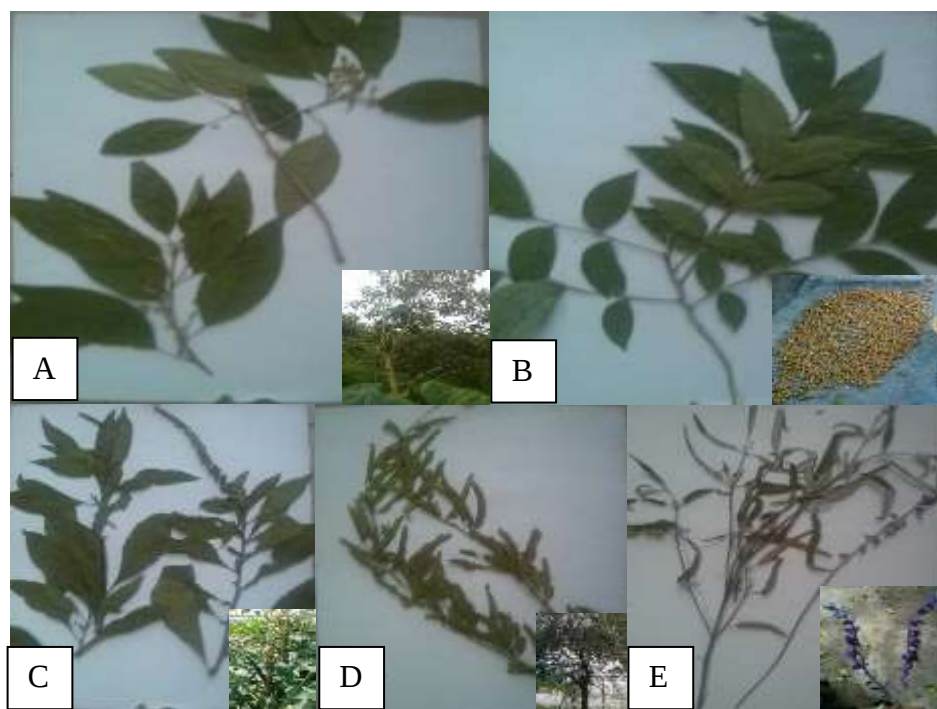


Figura 3.2. Identificación taxonómica de *Cestrum dumetorum* Schlecht (A), *Sapindus saponaria* (B), *Phytolacca icosandra* L. (C), *Prosopis laevigata* (Willd) (D), *Salvia leucantha* Cav. (E).

1.5.3 Evaluación *in vitro*

1.5.3.1 Método de difusión de discos de extractos metanólicos

Los análisis de varianza incluyendo a todos los tratamientos con base a las plantas y concentraciones evaluadas resultaron altamente significativos ($P < 0.0001$). En el Cuadro 3.2 se muestran los resultados de la prueba de comparación de medias por el método de la diferencia significativa honesta de Tukey con nivel de significancia al 5 %.

En el Cuadro 3.2 se muestra que en general *Prosopis laevigata* fue el extracto de la especie que presentó el mayor control en términos del porcentaje de inhibición, solo dominado por el producto biológico *Bacillus* spp. También se muestra que para *P. laevigata* las concentraciones muestran consistencia, presentando mayor control a mayor concentración.

Para poder evaluar y comparar el efecto promedio de la especie y de la concentración se realizó un análisis de varianza sin incluir los tratamientos correspondientes al producto químico (Tiabendazol) y al Biológico (*Bacillus* spp.) y considerando el resto de los tratamientos como un experimento factorial, dos factores (especies y concentración), el primero a 5 niveles y el segundo a 4 niveles. Los resultados se presentan en el Cuadro 3.3.

Con base en los resultados promedio (Cuadro 3.3), *Prosopis laevigata* presentó el mayor porcentaje de inhibición micelial (PIM) con 47.32 %, seguido de *Sapindus saponaria* (20.18 %), *Phytolacca icosandra* (18.12 %), *Salvia leucantha* (10.39 %) y *Cestrum dumetorum* (3.89 %). Mientras que la concentración al 75 % fue la que mejor inhibió el crecimiento micelial de

C. fruticola (34.34 %), sin embargo, para las concentraciones de 50 % o inferiores, el PIM resultó menor al 20 %.

Cuadro 3.2. Comparaciones de medias del porcentaje de inhibición de los extractos metanólicos incluyendo a todos los tratamientos (especies y concentraciones).

Especie	Concen- tración (%)	Media	Especie	Concen- tración (%)	Media	
<i>Bacillus spp.</i>	-----	78.07 a ¹	<i>P. icosandra</i>	25	10.64	gh
<i>P. laevigata</i>	75	65.24 b	<i>Tiabendazol</i>	-----	9.59	ghi
<i>P. laevigata</i>	50	46.35 c	<i>S. leucantha</i>	50	9.27	ghi
<i>P. laevigata</i>	25	44.03 c	<i>S. sapinaria</i>	10	8.35	ghi
<i>P. icosandra</i>	75	43.49 c	<i>S. leucantha</i>	25	7.40	ghij
<i>P. laevigata</i>	10	33.69 d	<i>S. leucantha</i>	10	5.44	ghij
<i>S. sapinaria</i>	75	32.49 d	<i>C. dumetorum</i>	75	4.69	hij
<i>S. sapinaria</i>	50	21.84 e	<i>C. dumetorum</i>	50	3.97	ij
<i>S. leucantha</i>	75	18.36 e	<i>C. dumetorum</i>	25	3.61	ij
<i>S. sapinaria</i>	25	17.33 ef	<i>C. dumetorum</i>	10	3.46	ij
<i>P. icosandra</i>	50	11.23 fg	<i>P. icosandra</i>	10	1.47	j
DSH ²		5.12				

¹: Medias con las mismas letras no son estadísticamente diferentes (Tukey, p=0.05)

²: Diferencia Significativa Honesta de Tukey

Cuadro 3.3. Comparaciones de medias para el porcentaje de inhibición de los extractos metanólicos, considerando solo la estructura factorial de los tratamientos para especie y concentración.

Especie	Media	N ¹	Concentración (%)	Media	N
<i>P. laevigata</i>	47.32 a ²	16	75	34.34 a	20
<i>S. saponaria</i>	20.18 b	16	50	19.29 b	20
<i>P. icosandra</i>	18.12 b	16	25	16.79 c	20
<i>S. leucantha</i>	10.39 c	16	10	11.60 d	20
<i>C. dumetorum</i>	3.89 d	16			
DSH ³		2.42	2.04		

¹: Numero de observaciones usadas para calcular la media

²: Medias con las mismas letras no son estadísticamente diferentes (Tukey, p=0.05)

³: Diferencia Significativa Honesta de Tukey

El mejor PIM (65.24 %) se obtuvo con el extracto metanólico *Prosopis laeviagata* al 75 %, mientras que a concentraciones de 50 y 25 % no existió diferencias significativas (46.35 y 44.03 %, respectivamente) (Cuadro 3.2, Figuras 3.3 y 3.4). Sin embargo, estos resultados son bajos respecto a los extractos metanólicos obtenidos con *Prosopis juliflora* al 15 %, el cual inhibió el 100 % el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* (Deressa *et al.*, 2015), en contraste con el presente estudio, que se obtuvo 44.02 % a una concentración similar.

En otro estudio, el extracto metanólico de *Prosopis juliflora* presentó el mayor efecto inhibitorio del crecimiento micelial de *Colletotrichum musae* (Bazie *et al.*, 2014b). El género *Prosopis* posee alto potencial para su uso en el manejo de hongos fitopatógenos en diversas formas de aplicación, Ehteshamul-Haque *et al.* (1996) reportaron que la aplicación de hojas secas de *Prosopis juliflora*, *Prosopis glandulosa* y *Prosopis cinererea* en el suelo, controlaron la infección de *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium solani*, causantes de la pudrición de las raíces de okra. Mientras que los extractos acuosos de hojas de *Prosopis juliflora* al 20 %, inhibieron completamente la germinación de *Phaeoisariopsis personata* y *Puccinia arachidis*, causantes de la mancha tardía de la hoja y roya en cacahuate, respectivamente (Kishore y Pande, 2005).

Sapindus saponaria obtuvo el segundo lugar, con un máximo PIM de 32.49 % al 75 % de concentración, sin embargo, el valor de inhibición de crecimiento obtenido es bajo en comparación con *Prosopis laevigata*, por lo tanto, no es un candidato para estudios posteriores. Este es el primer estudio utilizando esta especie, realizado para detectar el potencial de efecto fungicida contra hongos fitopatógenos (Figura 3.4 y 3.5).

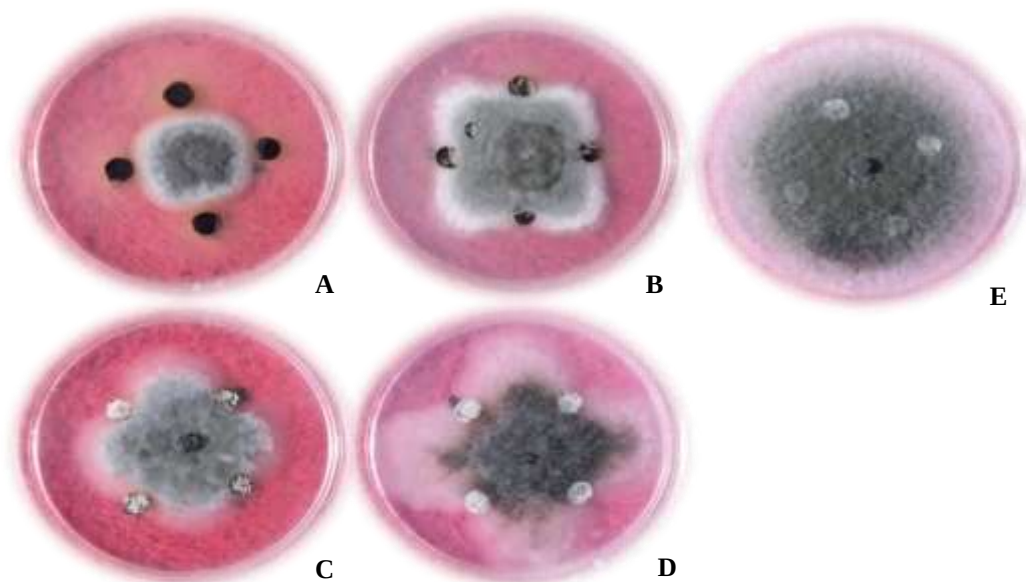


Figura 3.3. Efecto de los extractos metanólicos de *P. laevigata* (A: 75 %, B: 50 %, C: 25 %, D: 10 %), E: Control)

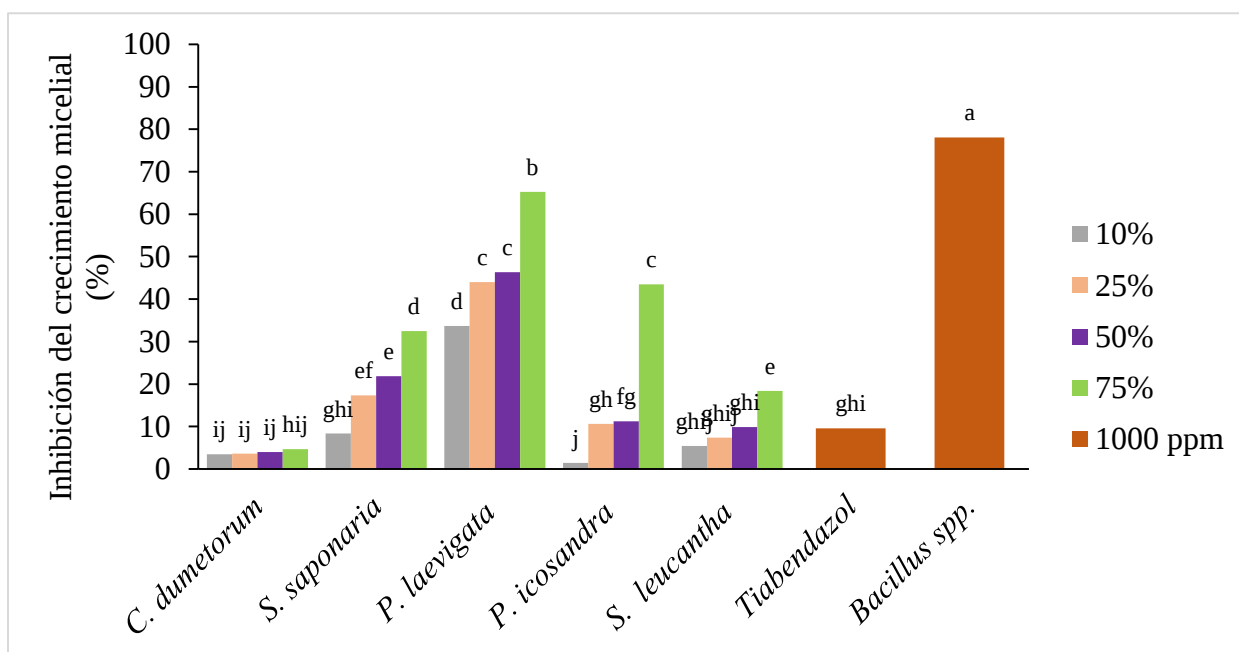


Figura 3.4. Efecto de extractos metanólicos de plantas sobre el crecimiento micelial de *C. fructicola* por método de discos. Barras con las mismas letras indican que las medias no fueron estadísticamente diferentes, usando la prueba de Tukey al 5 % de significancia.

Phytolacca icosandra (Figura 3.4 y 3.6), presentó un PIM máximo de 43.49 % a la concentración más alta (75 %), mientras que en las concentraciones menores se disminuyeron drásticamente (<12 %). Por lo que esta especie no posee buen potencial para su uso contra *C. fructicola*, debido a que se obtuvo un PIM similar utilizando el extracto metanólico al 25 % de *P. laevigata*. Aun cuando, según Hernández, *et al.*, 2013, la evaluación de extracto alcohólico al 15 % de *Phytolacca tetramera* resultó con mayor efecto fungicida sobre *C. gloeosporioides*.

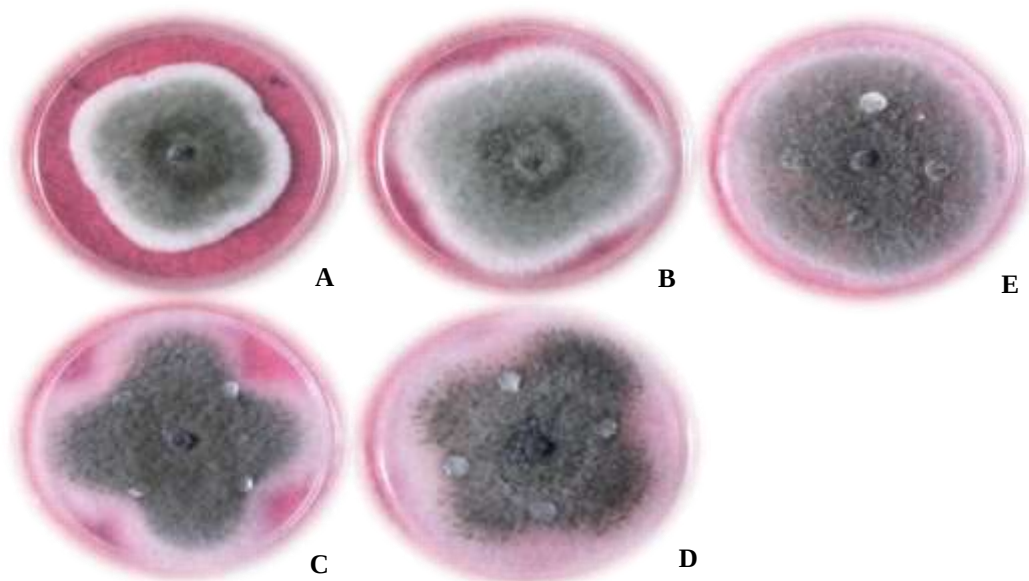


Figura 3.5. Efecto del extracto metanólico de *S. saponaria* (A: 75 %, B: 50 %, C: 25 %, D: 10 %), E: Control)

Los extractos metanólicos obtenidos de *Cestrum dumetorum* y *Salvia leucantha* (Figura 3.4, 3.7 y 3.8) fueron los menos eficaces para inhibir el crecimiento micelial (<5 % y <19 %, respectivamente) en todas las concentraciones evaluadas. Utilizando otras especies del género *Cestrum*, se han encontrado buenos resultados. Al-Reza *et al.*, (2010) reportó actividad

antifúngica importante contra *Fusarium solani* (78.9 %), *Botrytis cinerea* (76.3 %), *Sclerotinia sclerotiorum* (75.2 %), *Rhizoctonia solani* (72.1 %), *Phytophthora capsici* (68.4 %), *Colletotrichum capsici* (68.4 %) y *Fusarium oxysporum* (67.0 %); Hernández-Alviter *et al.*, (2007), encontraron resultados eficaces de *C. nocturnum* para inhibir la germinación conidial de *C. gloeosporioides*.

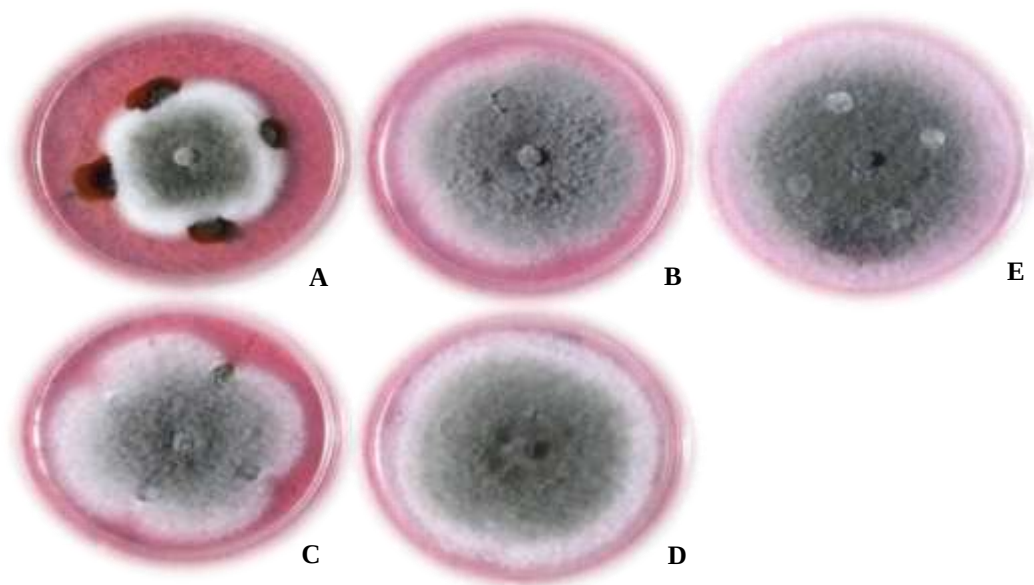


Figura 3.6. Efecto de extracto metanólico de *P. icosandra*. (A: 75 %, B: 50 %, C: 25 %, D: 10 %), E: Control)

En cuanto a otras especies de *Salvia*, se ha observado potencial inhibitorio de extracto metanólico de *S. officinalis* al 4 % contra *Alternaria solani* (Yanar *et al.*, 2011), *Fusarium verticillioides* y *F. proliferatum* de extractos diclorometano-metanólicos de *Salvia africana-lutea*, con una concentración de 0.031 mg mL^{-1} y 0.063 mg mL^{-1} , respectivamente (Nkomo *et al.*, 2014). El efecto de los extractos de plantas contra el crecimiento micelial de *C. fruticola*, varía dependiendo del tipo de planta usada y el nivel de concentración utilizado, concordando

con los resultados reportados por Deressa *et al.*, (2015), además varía en función de la metodología de preparación (disolvente, seco, fresco, tiempo de almacenamiento, etc.), especie botánica, órgano de la planta (raíces, hojas, semillas, etc.), fecha de cosecha, etc. (Hernández-Lauzardo *et al.*, 2007).

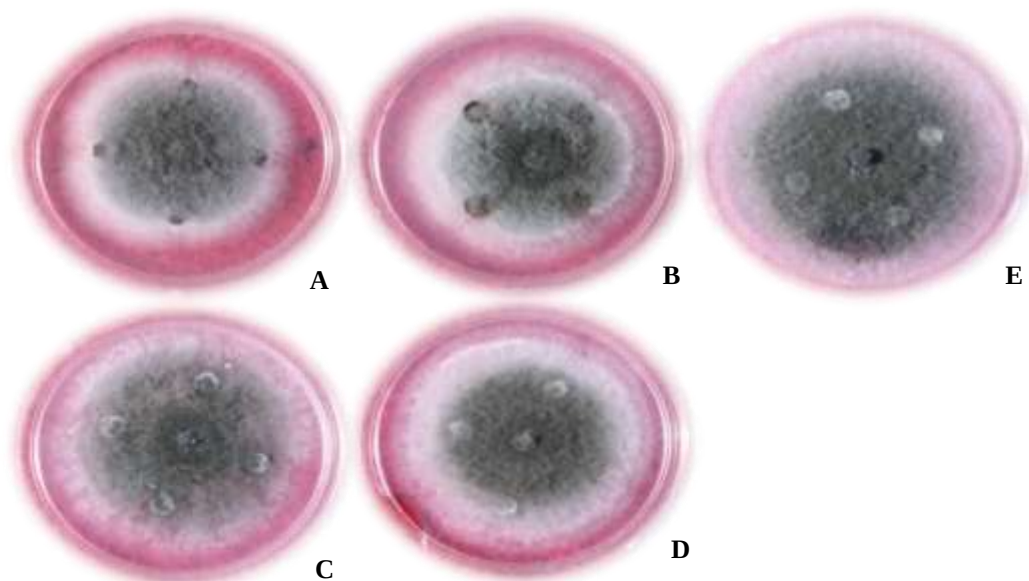


Figura 3.7. Efecto del extracto metanólico de *S. leucantha* (A: 75 %, B: 50 %, C: 25 %, D: 10 %), E: Control)

En cuanto al tratamiento biológico, fue el más eficaz para inhibir el crecimiento micelial con un PIM de 78 %; presentando una diferencia de 13 % con *P. laevigata* al 75 %. En el experimento de envenenamiento de medio, presentó mayor inhibición (92.82 %), debido a que el hongo entró en contacto directo inmediatamente después de la inoculación. Ashwini y Srividya (2014) reportaron una inhibición micelial de 57 % contra *C. gloeosporioides* causante de antracnosis en chile y Han *et al.* (2015) reportaron inhibiciones de 60.15 % para *C. acutatum* y 58.12 % para *C. gloeosporioides*, en ambos ensayos los porcentajes fueron menores que el presente estudio. Resultados con mejores eficacias se obtuvieron con las especies *Bacillus pumilus*

(88.87 %) y *B. thuringiensis* (80.07 %), debido a los metabolitos volátiles producidos como 2-nonanona, β -bencenoetanamina, 2-decanona y timol producidos por las bacterias (Zheng *et al.*, 2013).

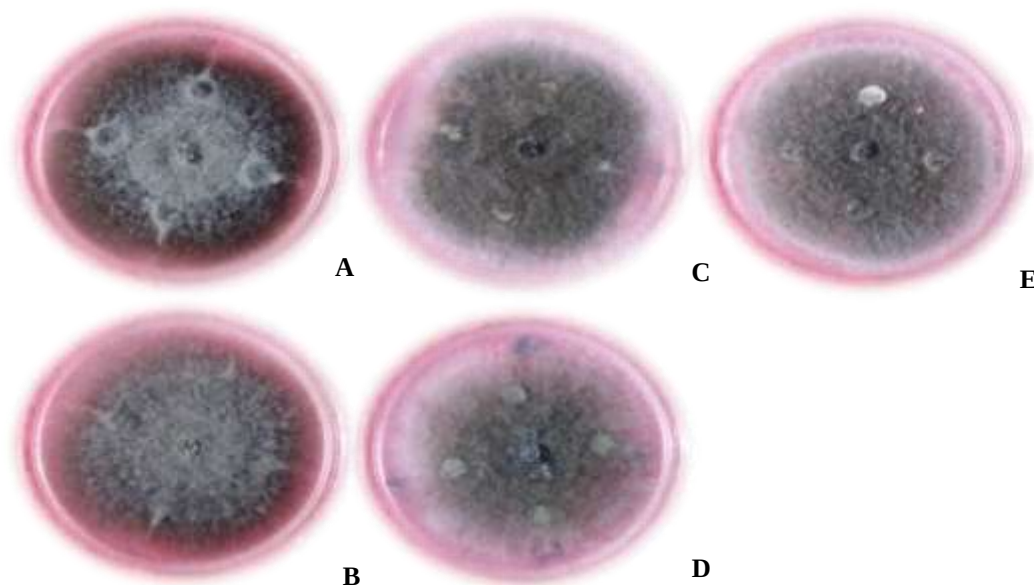


Figura 3.8. Efecto del extracto metanólico de *C. dumetorum* (A: 75 %, B: 50 %, C: 25 %, D: 10 %), E: Control)

En su presentación comercial Serenade®, ha mostrado gran potencial *in vitro* para inhibir el 100 % del crecimiento micelial de *Colletotrichum acutatum*, debido a la producción de metabolitos termoestables (Moreira *et al.*, 2014), aunque también los metabolitos volátiles poseen efecto en la germinación de conidios y elongación del tubo germinativo en *Botrytis cinerea* (Chen *et al.*, 2008). El gran potencial de *B. subtilis* como agente de control biológico contra bacterias y hongos se debe a que produce más de una docena de antibióticos diferentes (Stein, 2005), además de inducir resistencia sistémica adquirida (Choudhary y Johri, 2009) y ser promotor de

crecimiento en plantas, por lo que lo hacen un producto con gran potencial para el uso en el sistema de manejo integrado de plagas y enfermedades (Pérez-García, 2011).

El fungicida químico, mostró resultados bajos de inhibición (<10 %) a una concentración alta (1000 mg L⁻¹), con respecto al resto de los tratamientos, utilizando el método de difusión de discos. Estos resultados se confirmaron en el segundo experimento utilizando el método de envenenamiento de medio, obteniendo un PIM de 10.92 %. No se observaron diferencias significativas del fungicida químico con los extractos de *C. dumetorum* (todas las concentraciones), *P. icosandra* y *S. leucantha* (concentraciones ≤50 %) y *S. saponaria* (concentración al 10 %). Sanders *et al.* (2000) reportaron alta sensibilidad a tiabendazol de 158 aislamientos de *C. gloeosporioides*, concentraciones ≤2.5 mg L⁻¹, mientras que en la evaluación de varias especies de *Colletotrichum* aislados de mango, se encontró que *C. fructicola* fue el menos sensible a tiofanato-metílico (Lima *et al.*, 2014), el cual está muy relacionado con tiabendazol y podría generar resistencia cruzada (Delp, 1980). Se ha demostrado que varias especies de *Colletotrichum* generan resistencia a fungicidas benzimidazoles. De Bellaire y Dubois (1997) reportaron aislamientos de *C. musae* resistentes a tiabendazol, usando una concentración de 50 mg L⁻¹, lo cual fue correlacionado con la aplicación exclusiva de benomil (benzimidazol) en campo, generando resistencia cruzada. Sin embargo, Gang *et al.*, (2015) mencionaron que el desarrollo de la resistencia podría estar relacionado con la genética del patógeno más que con las estrategias de manejo, y una apropiada aspersión de fungicida en campo puede incrementar el control de la antracnosis. Por tanto, *C. fructicola* puede ser

resistente debido a la aplicación prolongada de benzimidazoles, ya que se ha demostrado ampliamente que las especies de *Colletotrichum* generan resistencia cruzada a benzimidazoles.

1.5.3.2 Método de difusión de discos con extractos hexánicos

Los extractos hexánicos tuvieron muy bajo efecto para inhibir el crecimiento de *C. fruticola*, obteniendo resultados <12 % para todas las plantas y concentraciones evaluadas (Figura 3.9 y 3.10). El mayor PIM se obtuvo con *S. leucantha* (11.63 %). Resultados similares se encontraron con extracto hexánico de *Suadea vermiculata* y *Prosopis farcta*, los cuales no mostraron ninguna actividad microbial contra *F. oxysporum* y bacterias patógenas de humanos (Mahasneh *et al.*, 1996). De manera similar Bajpai *et al.* (2008) encontró bajo porcentaje de inhibición contra *Phytophthora capsici* y *Botrytis cinerea* utilizando *Silene armería*. Sahin *et al.* (2003) no encontraron inhibición antibacterial de extractos hexánicos de *Satureja hortensis* contra 50 especies diferentes.

Sin embargo, el efecto de los extractos hexánicos parece depender de las plantas de las cuales se extrae, debido a que cada especie contiene metabolitos secundarios diferentes con diferente polaridad y en distintas cantidades, cuanto mayor es la variedad de compuestos que se extraen por el agente de extracción (disolvente), mejor será la posibilidad de que también se extraerán componentes biológicamente activos si no se tiene la certeza de cuál componente químico se desea extraer (Eloff, 1997). Por ejemplo, se ha reportado inhibición de la biomasa fúngica de *Macrophomina phaseolina* de >50 % con extractos hexánicos de *Chenopodium album*, *C.*

murale y *C. ambrosioides* (Javaid y Amin, 2009), y la inhibición de diversas especies de hongos dermatofitos con extractos hexánicos de *Psidium guajava* (Padrón-Márquez *et al.*, 2012).

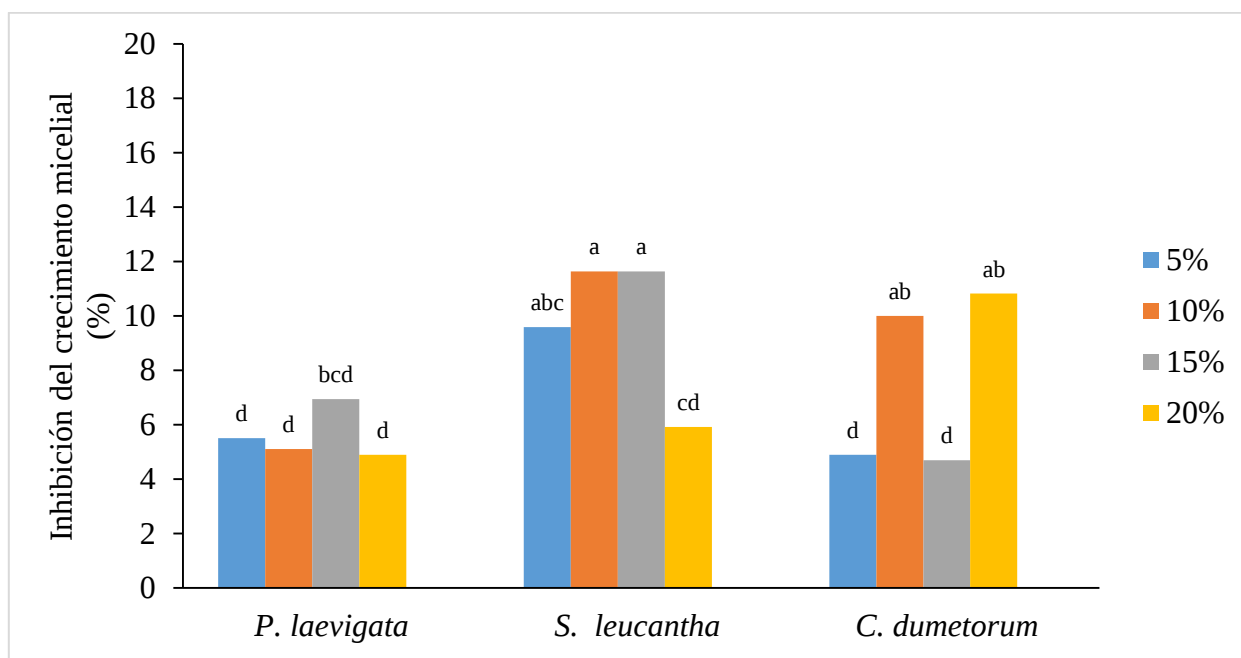


Figura 3.9. Efecto de extractos hexánicos de plantas sobre el crecimiento micelial de *C. fruticola* por método de discos. Barras con las mismas letras indican que las medias no fueron estadísticamente diferentes, usando la prueba de Tukey al 5 % de significancia.

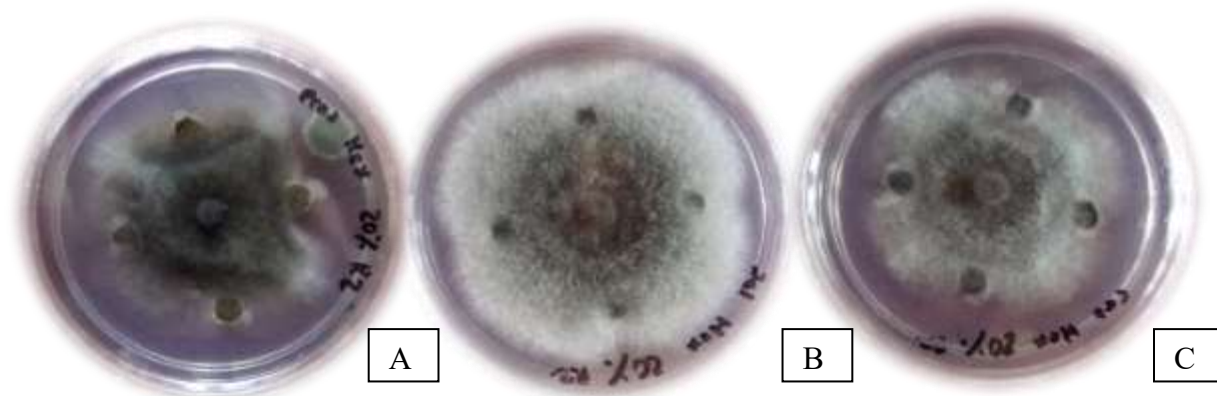


Figura 3.10. Efecto de los extractos hexánicos de *P. laevigata* (A), *S. leucantha* (B), *C. dumetorum* (C), a 20 % de concentración

1.5.4 Ensayo de inhibición de *P. laevigata* con concentraciones menores

En la segunda prueba con extractos metanólicos de *P. laevigata* evaluados con método de envenenamiento del medio, se presentaron resultados similares que con el método de discos a las mismas concentraciones. Sin embargo, se observó una mejor inhibición del crecimiento micelial, debido a que el hongo entra en contacto directo con el extracto inmediatamente después de la inoculación.

Cuadro 3.4. Comparaciones de medias para el porcentaje de inhibición para diferentes concentraciones de extracto de *P. laevigata*, usando el método de envenenamiento del medio.

Tratamiento	Media	Concentración Extracto (%)	Media
<i>Bacillus spp.</i>	92.83 a ¹	25	53.57 a
<i>P. laevigata</i> 25 %	53.57 b	20	42.35 b
<i>P. laevigata</i> 20 %	42.35 c	15	41.33 b
<i>P. laevigata</i> 15 %	41.33 c	10	40.31 b
<i>P. laevigata</i> 10 %	40.31 c	5	15.31 c
<i>P. laevigata</i> 5 %	15.31 d	1	4.33 d
Tiabendazol	10.94 de		
<i>P. laevigata</i> 1 %	4.33 e		
DSH ²	7.19		8.37

¹: Medias con las mismas letras no son estadísticamente diferentes (Tukey, p=0.05)

²: Diferencia Significativa Honesta de Tukey

En el Cuadro 3.4 se muestran los resultados de las comparaciones de medias bajo dos alternativas: i).- considerando a las diferentes concentraciones de extracto de *P. laevigata* e incluyendo también a los tratamientos químico (Tiabendazol) y el biológico (*Bacillus spp.*); y ii).- considerando exclusivamente las diferentes concentraciones de extracto de *P. laevigata*.

El mayor PIM (53.57 %) se obtuvo a la concentración de 25 %, mientras que en las concentraciones 20, 15 y 10 %, no se observaron diferencias significativas, obteniendo un rango de PIM de 42 a 40 %. Sin embargo, a la concentración 5 %, el PIM disminuyó drásticamente a 15.31 % (Cuadro 3.4, Figura 3.11 y 3.12). El mayor efecto de los extractos metanólicos de *P. laevigata*, puede deberse a la presencia de tres tipos de metabolitos: flavonoides, terpenoides y alcaloides, o bien a un efecto sinérgico entre los tres grupos de metabolitos. Bernard y Philogene (1993) señala que los productos sinérgicos incorporados a formulaciones aumentan la eficacia de los productos activos. Los flavonoides son sintetizados por las plantas en respuesta a la infección microbial y son frecuentemente encontrados efectivos *in vitro* como sustancias antimicrobiales contra un amplio rango de microorganismos, debido a su habilidad de formar complejos con proteínas solubles y extracelulares (Cowan, 1999; Gurjar *et al.*, 2012). Mientras que, el mecanismo de acción de los terpenoides no está totalmente entendido, pero se especula que también están involucrados en la disrupción de membranas por los compuestos lipofílicos. Por último, el mecanismo de acción de los alcaloides se le atribuye a su habilidad de intercalarse con el ADN (Cowan, 1999). La presencia de éstos compuestos y la suma de sus mecanismos de acción, pueden resultar en el buen efecto en la inhibición de *C. fructicola*, además al tener actividad inhibitoria a bajas concentraciones puede ser una buena fuente de componentes bioactivos con potencial antifúngico.

Estos resultados, así como otros con diferentes especies de *Prosopis*, sugieren que los compuestos biológicamente activos pueden ser utilizados para la investigación de agentes antifúngicos alternativos contra la antracnosis causada por especies de *Colletotrichum* (Deressa *et al.*, 2015).

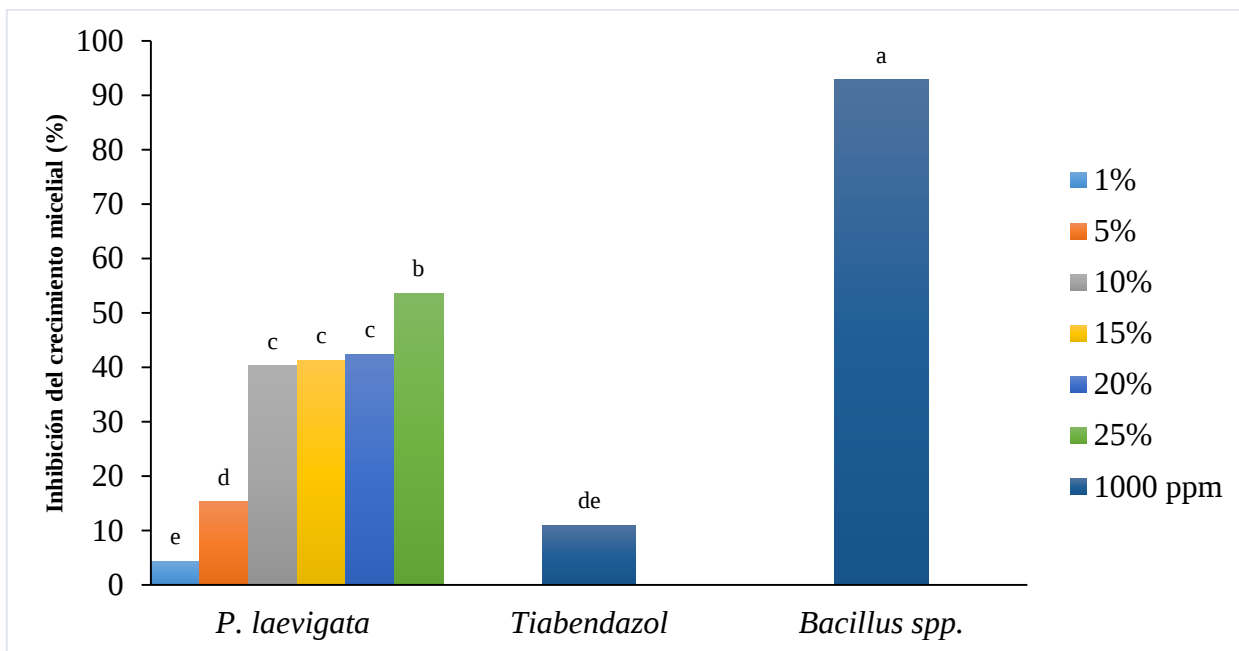


Figura 3.11. Efecto de extractos metanólicos de *P. laevigata* sobre el crecimiento micelial de *C. fructicola* por el método de envenenamiento del medio. Barras con las mismas letras indican que las medias no fueron estadísticamente diferentes, usando la prueba de Tukey al 5 % de significancia.

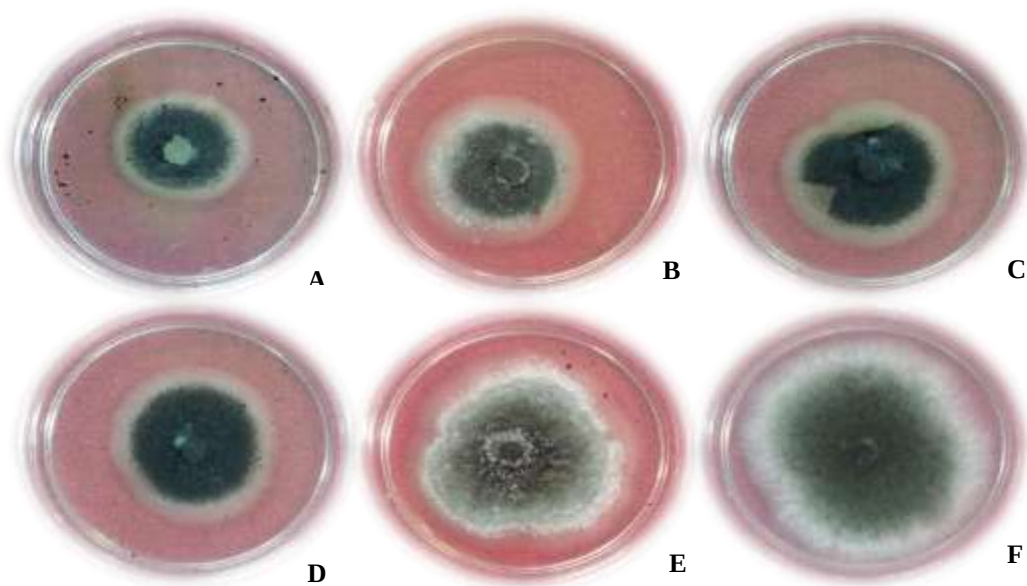


Figura 3.12. Efecto de extracto metanólico de *P. laevigata* a concentraciones bajas, A (1 %), B (5 %), C (10 %), D (15 %), E (20 %) y F (Control).

Sin embargo, se necesita mayor investigación para determinar el efecto de estos compuestos en los cambios moleculares, morfológicos y bioquímicos en el patógeno y sus hospedantes (Castillo *et al.*, 2012). También, sería conveniente, realizar la separación y elucidación de los metabolitos secundarios presentes en *P. laevigata* y evaluar su efecto individual, o determinar la existencia de sinergismo entre estos metabolitos sobre la inhibición del crecimiento micelial de *C. fructicola*.

1.5.5 Determinación de metabolitos secundarios

La presencia de los metabolitos en los extractos metanólicos se determinó por medio de cromatografía de capa fina (Figura 3.13). *P. laevigata*, fue la única planta evaluada que presentó alcaloides, flavonoides y terpenoides, por lo que su efecto antifúngico puede ser mejor que aquellas especies que no presentaron estos tres grupos de metabolitos secundarios. El estudio hecho por Lakshmi *et al.*, (2010), demuestra la actividad antimicrobial de las hojas de *Prosopis juliflora* contra fitopatógenos y reportaron la presencia de β -sitosterol, prosopidiona un terpeno dicetónico y tres alcaloides secojuliprosopinal, 3'oxojuliprosopino y juliprosopino, los autores mencionan que la actividad antimicrobial de los extractos metanólicos se debe al efecto sinérgico de los alcaloides de las hojas, los cuales son solubles en agua. El metanol es un disolvente polar, con el cual se pueden extraer varios tipos de metabolitos con diferente actividad antimicrobial tales como alcaloides, glucósidos triterpénicos, taninos, lactonas sesquiterpénicas y compuestos fenólicos (Talibi *et al.*, 2014). La diferente actividad de cada extracto, de acuerdo con lo mencionado por Díaz (2016) se podría deber a varios factores: a) especie del hongo; b) patogenicidad del hongo; c) disolvente utilizado; d) mecanismos de

resistencia (enzimáticos, estructurales, cambio de la permeabilidad de la membrana que le permitan aprovechar, evitar o detoxificar alguno de los compuestos presentes en los extractos vegetales).

Cuadro 3.5. Metabolitos presentes en los extractos metanólicos de las especies evaluadas

No.	Material vegetal	Alcaloides	Flavonoides	Terpenoides
1	<i>Phytolacca icosandra</i> L.	+	+	
2	<i>Salvia leucantha</i> Cav.		+	+
3	<i>Sapindus saponaria</i> L.			
4	<i>Cestrum dumetorum</i> Schelecht		+	+
5	<i>Prosopis laevigata</i> (wild)	+	+	+

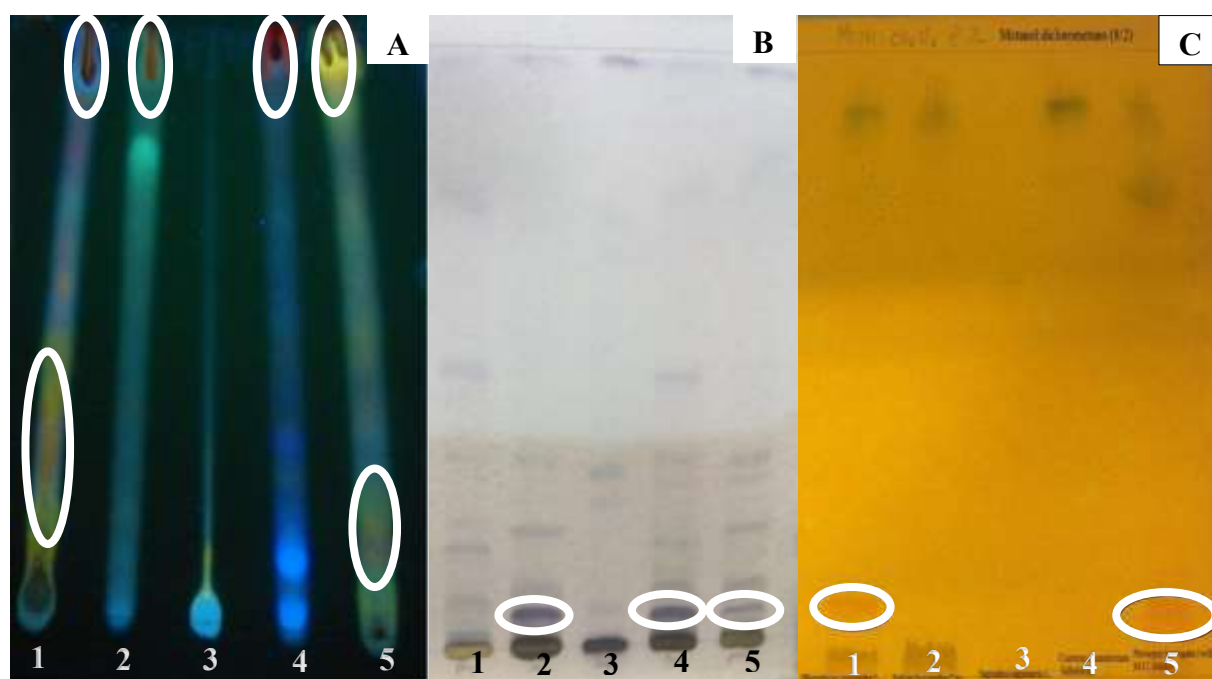


Figura 3.13. Análisis fitoquímico por cromatografía de capa fina para determinación de flavonoides (A), terpenoides (B) y alcaloides (C). 1, *P. icosandra*; 2, *S. leucantha*; 3, *S. saponaria*; 4, *C. dumetorum*; 5, *P. laevigata*.

1.5.6. Modelación del potencial de inhibición del extracto de *P. laevigata*

Para determinar la concentración mínima necesaria para obtener un porcentaje de inhibición micelial específico deseado, (90 o 50 %), regularmente se utilizan los modelos Probit. Sin embargo, en este caso no fue posible utilizarlos debido a que los resultados presentaron una tendencia no consistente entre las concentraciones utilizadas y el porcentaje de inhibición logrado. Por esta razón fue necesario emplear en su lugar un modelo de Regresión Polinomial de grado 3 completo, esto es, incluyendo el término lineal, el cuadrático y el cúbico. El modelo obtenido fue el siguiente: $PIM = -5.73 + 7.12 C - 0.38 C^2 + 0.007 C^3$

El ajuste de este modelo fue bastante bueno con un valor de R^2 de 0.93; el modelo completo fue altamente significativo ($p < 0.0001$); por su parte, los coeficientes de regresión lineal y cuadrático fueron altamente significativos ($p = 0.0005$, y 0.0016), mientras que el término cúbico fue significativo solo al 5 % ($p = 0.0484$).

En la Figura 3.14 se muestra el comportamiento de este modelo, para los valores de concentración utilizados, de 1 al 25 %. En la figura se observa que el valor máximo de inhibición alcanzado en la concentración más alta empleada en el estudio fue ligeramente superior de 50 %. También se puede observar que en un principio al pasar de concentraciones bajas del orden 1 a 15 % la respuesta en el incremento del porcentaje de inhibición fue muy alta, sin embargo a partir de la concentración de 20 % el incremento ya no es tan significativo. Se debe tener cuidado con tratar de extrapolar los resultados de este modelo a valores mayores de concentración del extracto para tratar de predecir el porcentaje de inhibición micelial, ya que desafortunadamente para valores mayores de concentración la tendencia del modelo no es clara ni confiable.

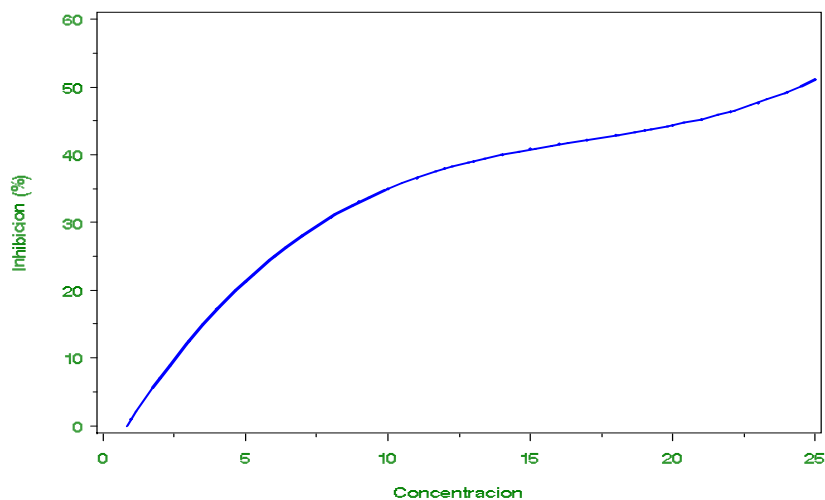


Figura 3.14. Comportamiento del modelo de Regresión Polinomial de grado cubico completo. Para valores de concentración del extracto de *P. laevigata* en el rango de 1 a 25 %.

1.6 CONCLUSIONES

El extracto metanólico obtenido de *Prosopis laevigata*, a una concentración de 75 %, fue el más eficaz para inhibir el crecimiento micelial de *C. fruticola* (65.24 %), en condiciones *in vitro*. Sin embargo, *Bacillus* spp. resultó 12.83 % mejor que *P. laevigata*. El aislamiento utilizado para la evaluación, resultó no sensible a Tiabendazol, posiblemente debido al desarrollo de resistencia cruzada por la aplicación de otros benzimidazoles en condiciones de campo, y la alta tasa de desarrollo de resistencia de la diversidad de especies de *Colletotrichum*. Los extractos hexánicos presentaron baja actividad fungicida (< 12 %), lo cual los descarta como posibles agentes fungicidas. Se utilizaron dos técnicas de bioensayo *in vitro*, por discos y por envenenamiento del medio, siendo la segunda la más efectiva para obtener porcentajes de inhibición más altos, al entrar en contacto con el extracto inmediatamente después de la inoculación.

CAPITULO IV. MANEJO *in vivo* DE *Colletotrichum fructicola* EN FRUTOS DE AGUACATE cv. HASS

1.7 INTRODUCCIÓN

El aguacate es un fruto perecedero con alta tasa metabólica que resulta en una vida útil de tan sólo tres a cuatro semanas a temperatura y humedad relativa óptimas (Yahia y Gonzalez-Aguilar, 1998), además, es un producto con alto valor para la exportación lo cual hace que lograr una buena calidad a su destino final sea un reto importante (Kassim *et al.*, 2013). Cerca de 20 – 25 % de las frutas y 30 – 40 % de las hortalizas se pierden debido a prácticas incorrectas posteriores a la cosecha, durante la recolección, clasificación, embalaje, almacenamiento, etc., sin embargo, estas pérdidas se pueden reducir en cierta medida a través de la adopción de métodos como cosecha en el estado de madurez adecuado, limpieza, lavado, selección y clasificación, recubrimiento con ceras, embalaje, pre-enfriado, tratamiento químico, irradiación, temperatura y humedad de almacenamiento (Somesh *et al.*, 2016). Algunas otras medidas pertinentes para la mejora de la calidad y prolongación del tiempo de almacenamiento del aguacate son los tratamientos térmicos antes del empacado, acondicionamiento a bajas temperaturas, aclimatación hipóxica en ambientes bajos en oxígeno, uso del 1-Methilciclopropeno (1-MCP) como inhibidor de la acción del etileno, uso de empaques plásticos, atmósferas modificadas, atmósferas controladas y sistemas de almacenamiento en atmósferas modificadas y semi-activas (Kassim *et al.*, 2013). El principal problema poscosecha en aguacate es debido a especies del género *Colletotrichum*, las cuales causan síntomas típicos conocidos como antracnosis, caracterizados por tejido necrótico hundido donde se producen

masas de conidios color naranja. La habilidad de *Colletotrichum* de causar infecciones latentes y quiescentes lo han colocado entre los patógenos poscosecha más importantes (Freeman *et al.*, 1998). Permanece quiescente, como biotrofo, durante el crecimiento del fruto y cosecha, pero activa su desarrollo y se transforma a necrotrofo debido a los síntomas de decaimiento durante la maduración y senescencia una vez cosechados los frutos (Prusky y Lichter, 2007). Para el manejo poscosecha de la antracnosis en aguacate, generalmente se han empleado fungicidas químicos, siendo procloraz de los más efectivos (Muirhead *et al.*, 1982). Sin embargo, algunas especies de *Colletotrichum* han desarrollado resistencia a algunos fungicidas químicos tales como benzimidazoles y quinonas (Meazza *et al.* 2003); aunado a lo anterior, el incremento en la demanda de alimentos naturales ha llevado a la investigación de agentes antimicrobianos alternativos dentro de la industria alimentaria (Temesgen *et al.*, 2015). Hay muchas investigaciones que demuestran que el uso de extractos de plantas puede ser una alternativa de manejo de enfermedades fitopatógenas, además de ser seguros para el medio ambiente y no causar daños a los consumidores. Los extractos de plantas que han demostrado tener actividad inhibitoria en especies del género *Colletotrichum* han ido en aumento, entre las cuales se tienen: *Cestrum nocturnum* (Hernández-Albíter *et al.*, 2007), *Phytolacca tetramera* (Hernández *et al.*, 2013), *Prosopis juliflora* (Bazie *et al.*, 2014; Temesgen *et al.*, 2015), *Lantana camara* L (Ravneel y Anamika, 2015), *Camellia semiserrata* Chi (Xiangchun *et al.*, 2015).

1.8 OBJETIVO

- ❖ Evaluar la eficacia poscosecha del extracto metanólico de *Prosopis laevigata* contra *Colletotrichum fruticola* en frutos de aguacate cv. Hass aplicado en diferentes tiempos

1.9 HIPÓTESIS

El extracto metanólico de *P. laevigata* tendrá efecto inhibitorio de la antracnosis en poscosecha de frutos de aguacate cv. *Hass*, el cual depende del tiempo de la aplicación.

1.10 MATERIALES Y MÉTODOS

1.10.1 Ensayo *in vivo*

Se prepararon tres concentraciones del extracto metanólico de *P. laevigata* (40, 60 y 80 %). Como tratamientos se evaluaron las combinaciones de las tres concentraciones de extracto y tres tiempos de aplicación del extracto: i) 24 h antes de la inoculación, ii) al mismo tiempo de la inoculación y iii) 24 h después de la inoculación, contra *C. fructicola* en frutos de aguacate *Hass*. Se utilizaron cuatro frutos para la aplicación de cada tratamiento, para ello se lavaron por 1 min con agua corriente, seguida de una esterilización superficial por inmersión de los frutos en etanol al 70 % durante 3 min, posteriormente en hipoclorito de sodio al 1 % por 3 min, y por último, se lavaron dos veces con agua destilada esterilizada por 2 min en cada ocasión y se secaron con papel absorbente estéril (Cai *et al.*, 2009). Para la evaluación del tiempo de aplicación del extracto, los frutos se sumergieron en el extracto i) 24 h antes de la inoculación con *C. fructicola*, ii) al mismo tiempo que la inoculación y iii) 24 h después de la inoculación (Landeró *et al.*, 2013). La inoculación se realizó colocando 30 μL de una solución de esporas 1×10^6 conidios mL^{-1} . Además del efecto del extracto también se evaluó un fungicida comercial Tecto® (Tiabendazol 1 gL^{-1}), un fungicida biológico Solba (*Bacillus* spp. 1 gL^{-1}), un tratamiento control positivo (frutos inoculados sin aplicación de extracto metanólico) y un tratamiento control negativo (sin inoculación ni aplicación de extracto metanólico). Los frutos se colocaron en cámara húmeda en condiciones estériles por 10 d a 25 °C. La severidad de la enfermedad se

determinó por observación y se registraron los niveles de síntomas de la enfermedad de acuerdo con el área de la superficie infectada en el fruto usando una escala de valores de 0 a 6, en la cual se asigna una puntuación de 1 para el caso de área superficial no infectada; 2 para niveles de infección entre 0 - 5 %; 3 para >5 - 25 %; 4 para >25 - 50 %; 5 para >50 - 75 % y 6 para >75 %; de área superficial infectada, respectivamente (Temesgen *et al.*, 2015).

1.10.2 Diseño experimental

Los tratamientos se arreglaron mediante un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones, donde cada unidad experimental consistió en un fruto de aguacate inoculado.

1.10.3 Análisis estadístico

Se realizó el análisis de varianza considerando la estructura factorial de concentración del extracto (a tres niveles) y tiempo de aplicación del extracto en relación a la inoculación (a tres niveles), así como una comparación múltiple de medias con el método de la diferencia significativa de Tukey, con nivel de significancia al 5 %, utilizando el software SAS (SAS, 2016).

1.11 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.11.1 Ensayo *in vivo*

Los resultados mostraron que la concentración de 80 % fue la mejor para inhibir el crecimiento de *C. fructicola* después de 10 d de la inoculación comparado con el control positivo, el fungicida químico Tecto® (tiabendazol 1 gL⁻¹) y el fungicida biológico Solba (*Bacillus* spp. 1 gL⁻¹). A una concentración de 80 % se obtuvo un valor promedio de severidad de 1.9, lo cual representa menos de 5 % de superficie infectada (Figura 4.1). No se observó diferencia

significativa entre los tratamientos de aplicación de las concentraciones de 40 y 60 %, usando la prueba de Tukey al 5 % de significancia (Cuadro 4.1). Se observó una relación directamente proporcional entre la concentración del extracto y el efecto inhibitorio, a mayor concentración, mayor efecto inhibitorio. (Figura 4.1).

Cuadro 4.1. Comparaciones de medias para los valores de inhibición a diferentes concentraciones de extracto de *P. laevigata*, y tres tiempos de aplicación.

Concentración Extracto (%)	Media	tiempos de aplicación	Media
<i>P. laevigata</i> 80 %	1.91 c ¹	24 h antes	2.4 ab
<i>P. laevigata</i> 60 %	2.16 bc	Al mismo tiempo	2.3 b
<i>P. laevigata</i> 40 %	2.5 abc	24 h después	3.25 a
<i>Bacillus</i> spp. (1 gL ⁻¹)	3.08 ab		
Tiabendazol (1 gL ⁻¹)	3.58 a ¹		
DSH ²	1.09		0.85

¹: Medias con las mismas letras no son estadísticamente diferentes (Tukey, p=0.05)

²: Diferencia Significativa Honesta de Tukey

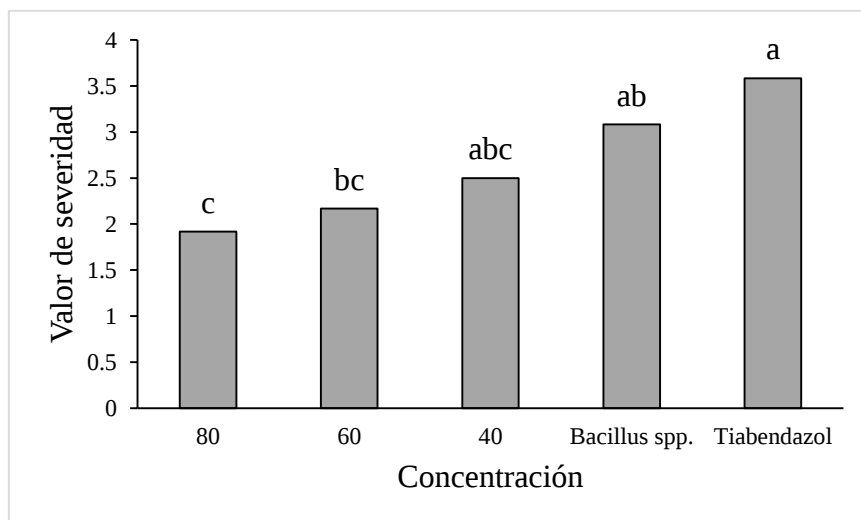


Figura 4.1. Efecto de la concentración de extracto metanólico de *P. laevigata* en la inhibición de *C. fruticola* en frutos de aguacate Hass. Barras con las mismas letras no fueron estadísticamente diferentes (Tukey, p=0.05)

El tiempo de aplicación con mejores resultados fue cuando el extracto se aplicó al mismo tiempo que la inoculación, sin embargo no mostró diferencia significativa con la aplicación 24 h antes de la inoculación (Figura 4.2).

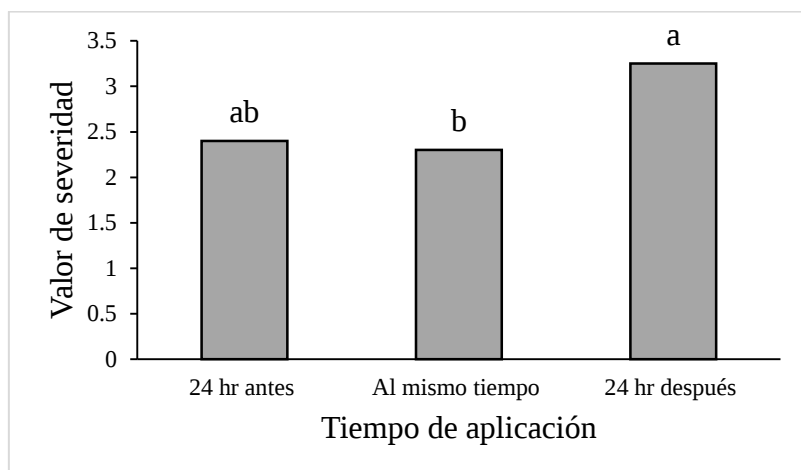


Figura 4.2. Efecto del momento de aplicación del extracto metanólico de *P. laevigata* en la inhibición de *C. fructicola* en frutos de aguacate Hass. Barras con las mismas letras no fueron estadísticamente diferentes (Tukey, $p=0.05$)

En la Figura 4.3 se muestra la actividad antifúngica *in vivo* del extracto metanólico de *P. laevigata* contra *C. fructicola*, determinada por la cantidad de superficie afectada asignando un valor a la severidad, lo cual muestra que el extracto puede ser una fuente potencial de compuestos antifúngicos al haber menos superficie afectada en aquellos frutos tratados a una concentración de 80 % aplicado al mismo tiempo que la inoculación con *C. fructicola*, además los extractos, como sus compontes, son más susceptibles a la degradación, de acuerdo con Chirinos (2009), las principales ventajas del uso de los extractos naturales son i) Por ser biodegradables no producen desequilibrios en el ecosistema, al ser de origen vegetal estos bioplaguicidas provocan un impacto mínimo sobre la fauna benéfica, son efectivos contra enfermedades y no tienen restricciones toxicológicas. ii) Son conocidos por el agricultor ya que

generalmente se encuentran en su medio. iii) La mayoría de los extractos tiene diversos usos, como es el caso de aquellos empleados por sus propiedades terapéuticas y efectos repelentes, entre otros. iv) Su rápida degradación disminuye el riesgo residual en los alimentos. v) Algunos pueden ser usados poco tiempo antes de la cosecha. vi) Muchos de estos compuestos no causan fitotoxicidad. vii) Desarrollan resistencia más lentamente que productos sintéticos

Se han reportado varios estudios enfocados a tratamientos poscosecha en el control del género *Colletotrichum*, Temesgen *et al.*, 2015 encontraron que los extractos de *Prosopis juliflora* y *Lantana camara* fueron los más efectivos para reducir el crecimiento micelial, desarrollo de conidios y desarrollo de la enfermedad causada por *C. gloeosporioides* en frutos de mango, encontrando que el efecto de los extractos dependerá de la especie de planta utilizada, el método de extracción y el tiempo de aplicación del extracto. La máxima reducción de la antracnosis por *Prosopis juliflora* fue cuando se aplicó al mismo tiempo que la inoculación, lo cual coincide con los resultados obtenidos en el presente trabajo. Sin embargo, Jat *et al.*, 2013, no encontraron diferencias entre un tratamiento pre y post inoculación, encontrando únicamente que la severidad de la podredumbre azul y la enfermedad provocada por *Aspergillus* se redujo significativamente en comparación con el control con cualquier tratamiento aplicado. En otro estudio donde se evaluó el efecto de los extractos acuosos de *P. juliflora* se encontró que la aplicación del extracto a una concentración de 20 % en combinación con un tratamiento térmico con agua a 50 °C en frutos de plátano, redujo el desarrollo de la antracnosis y mejoró la vida útil y la comercialización sin ningún efecto perjudicial sobre las propiedades físico-químicas de los frutos (Bazie *et al.*, 2014).

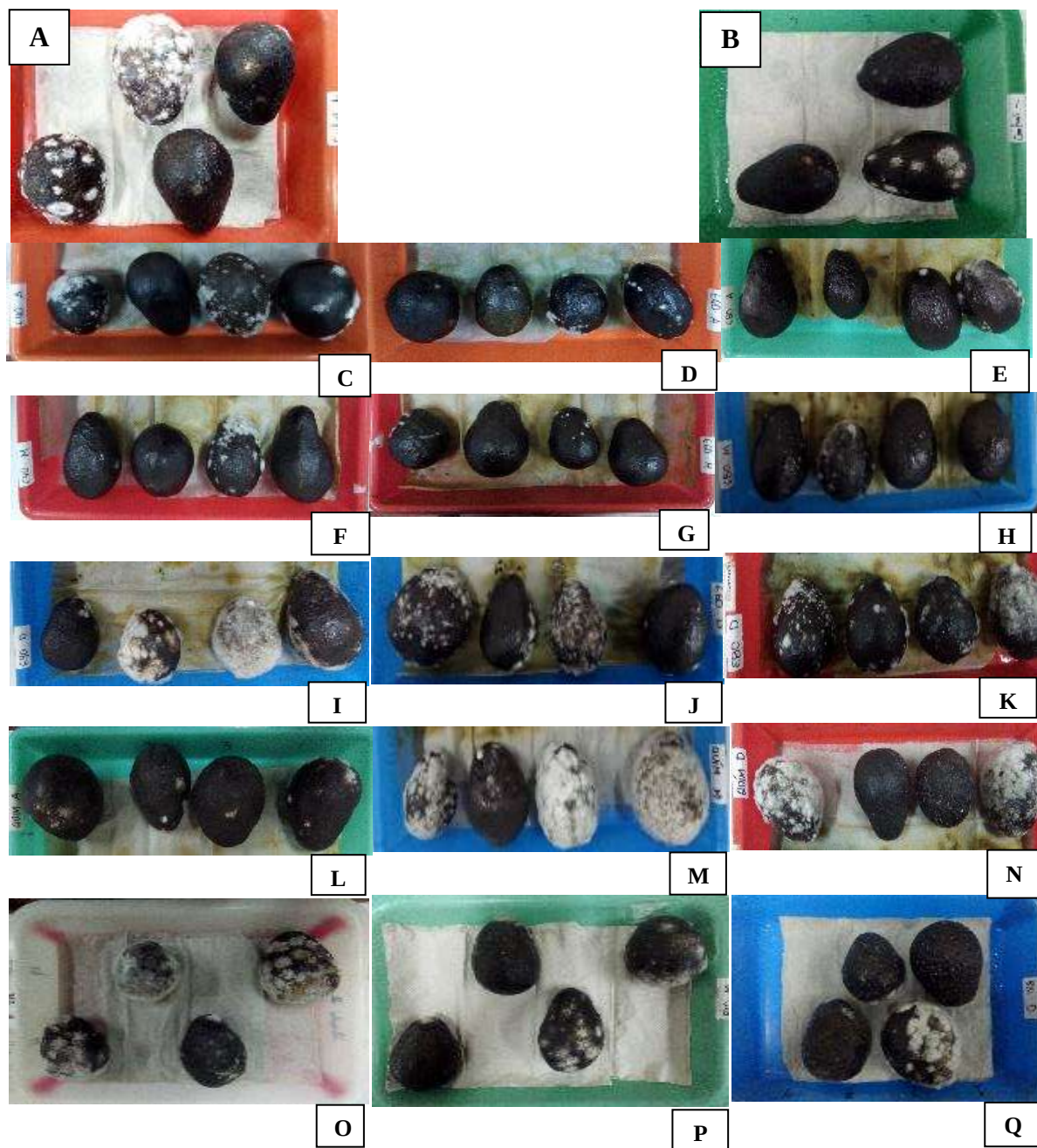


Figura 4.3. Efecto en la inhibición de *C. fruticola* con extracto metanólico de *P. laevigata*. A. Control positivo, B. control negativo, aplicación del extracto 24 h antes de la inoculación (C (40 %), D (60 %), E (80 %)), aplicación del extracto al mismo tiempo de la inoculación (F (40 %), G (60 %), H (80 %)), aplicación 24 h después de la inoculación (I (40%), J (60 %), K (80 %)), Tiabendazol, L (antes), M (al mismo tiempo), N (después), *Bacillus* spp (O (antes), P (al mismo tiempo), Q (después).

Para garantizar una correcta aplicación de los extractos vegetales, los productos que sean eficaces durante la aplicación *in vivo* deben cumplir: i) el producto debe ser eficaz incluso después de tratamientos de corta duración; ii) el tratamiento no debe tener un efecto sobre los parámetros de calidad tales como la acidez, sabor y aroma y iii) se debe utilizar la dosis adecuada más baja de los tratamientos para la aplicación práctica (Tripathi y Dubey 2003).

El valor de severidad obtenido por la aplicación del fungicida químico Tecto® (Tiabendazol 1 gL⁻¹) fue de 3.5, es decir, el valor más alto de todos los tratamientos, esto se pudo deber a que la capacidad para erradicar las infecciones de los fungicidas como benzimidazoles (tiabendazol, benomil, y carbenzin) y los inhibidores de esterol (imazalil, procloraz, y propiconazole), que proveen buen control para la antracnosis, depende en gran medida del tiempo transcurrido entre la infección y la aplicación, la ubicación de la infección, y el grado de penetración de los patógenos en el tejido del fruto (Droby *et al.*, 2011). Se ha documentado que el grupo de fungicidas benzimidazoles inhiben la formación del microtúbulo y el ensamble, la actividad en un solo sitio facilita el desarrollo de resistencia debido a la selección de genotipos de patógenos que producen ciertas mutaciones en el gen β -tubulina el cual puede persistir en las poblaciones de patógenos gracias a la selección disruptiva tiempo después de que el químico ha sido retirado (Rampersad y Teelucksingh, 2012). Se ha reportado que frutos de aguacate variedad *Hass* con concentraciones bajas de calcio son más susceptibles al desarrollo de la antracnosis, con el resultado de que los tratamientos fungicidas poscosecha pueden ser no efectivos, lo cual puede ser otra posible explicación del pobre efecto inhibitorio de Tiabendazol en este estudio (Bill *et al.*, 2014)

Con la aplicación de Solba (*Bacillus* spp.) se obtuvo un valor de severidad de 3.0, el cual no tuvo diferencia significativa con el tratamiento químico con Tiabendazol y el extracto metanólico de *P. laevigata* a 40 % de concentración. Un valor de 3.0 obtenido por *Bacillus* spp. representa un porcentaje de severidad en el rango de >5 - 25 % después de 10 ddi a temperatura ambiente. *Bacillus* spp. solo o combinado con un fungicida puede ser usado para el control de enfermedades poscosecha, la combinación con un fungicida reduce las concentraciones de fungicida sintéticos, por ejemplo, la combinación de *B. subtilis* y procloraz fue más efectivo que cuando se aplicaron de manera separada (Bill *et al.*, 2014) y reduce el costo de aplicación de los fungicidas biológicos, además de contribuir a la supresión del desarrollo de resistencia de los patógenos a los fungicidas (Janisiewicz y Conway, 2010). Sin embargo, los antagonistas microbianos cuando se aplican solos, generalmente no tienen el 100 % de control y el control resultante depende de la relación cuantitativa entre las poblaciones del antagonista, es decir, se requieren altas densidades de células antagonistas en los frutos para obtener un buen control, lo cual reduce los márgenes de beneficio (Sharma *et al.*, 2009), así mismo, su mayor limitación es que no puede controlar infecciones latentes que se inician en campo durante la fase de floración, madurez del fruto, en heridas hechas por manejo en la cosecha y transporte (Elangbam *et al.*, 2015), tal cual sucede con el ciclo de infección de *Colletotrichum* spp.

Las investigaciones más recientes se han enfocado en el uso de recubrimientos comestibles combinados con aceites esenciales como tratamientos poscosecha y que al mismo tiempo aportan beneficios en la vida de anaquel del producto. En el estudio realizado por Bill *et al.*, (2014) recomiendan una cubierta de quitosano + aceite de tomillo (3:1 v/v) como una alternativa

sustentable a las actuales de aplicación de procloraz en el control de la antracnosis en el fruto de aguacate durante el almacenamiento.

1.12 CONCLUSIONES

Los resultados demuestran que el extracto metanólico de *Prosopis laevigata* puede ser usado como un biofungicida potencial para el control de *Colletotrichum fructicola* en poscosecha al obtener mejor control que un fungicida químico (Tiabendazol 1 gL⁻¹) y un fungicida biológico (*Bacillus* spp. 1 gL⁻¹), además no es persistente debido a su rápida degradación. Los mejores resultados de inhibición se obtuvieron con la aplicación de extracto metanólico de *P. laevigata* a 80 % de concentración con un tiempo de aplicación al mismo tiempo que la inoculación. La utilización de extractos de plantas provee una alternativa amigable para el control de enfermedades fitopatógenas, además de ser de menor costo en investigación, desarrollo y registro que un fungicida químico. Los resultados de inhibición de los extractos dependen del tipo de planta utilizada, polaridad del disolvente empleado para la extracción de los metabolitos secundarios, el tiempo de aplicación del extracto y el tipo de microorganismo a controlar.

CONCLUSIONES GENERALES

El agente causal de la antracnosis del aguacate cv. *Hass* provenientes de Molango de Escamilla, Hidalgo, fue *Colletotrichum fructicola*, siendo éste el primer reporte en México del hongo en frutos de aguacate.

El extracto metanólico obtenido de *Prosopis laevigata*, a una concentración de 75 %, fue el más eficaz para inhibir el crecimiento micelial de *C. fructicola* (65.24 %), en condiciones *in vitro*. Sin embargo, *Bacillus* spp. resultó 12.83 % mejor que *P. laevigata*. El patógeno utilizado para la evaluación, resultó no sensible a Tiabendazol, posiblemente debido al desarrollo de resistencia cruzada por la aplicación de otros benzimidazoles en condiciones de campo, y la alta tasa de desarrollo de resistencia de la diversidad de especies de *Colletotrichum*. Los extractos hexánicos presentaron baja actividad fungicida (< 12 %), lo cual los descarta como posibles agentes fungicidas. Se utilizaron dos técnicas de bioensayo *in vitro*, por difusión de discos y por envenenamiento del medio, siendo la segunda la más efectiva.

El extracto metanólico de *P. laevigata* puede ser usado como un biofungicida potencial para el control de *C. fructicola* en poscosecha. Los mejores resultados de inhibición se obtuvieron con la aplicación de extracto metanólico de *P. laevigata* a 80 % de concentración con un tiempo de aplicación al mismo tiempo que la inoculación. La utilización de extractos de plantas provee una alternativa amigable para el control de enfermedades fitopatógenas, además de ser de bajo costo en investigación, desarrollo y registro que un fungicida químico.

RECOMENDACIONES

Hay varias áreas de esta investigación que requieren mayor exploración, una de ellas es evaluación de la seguridad en la utilización del extracto metanólico de *P. laevigata* sin ningún efecto perjudicial en la salud humana, al comprobar que no existe efecto tóxico, se puede continuar con el estudio de éste extracto aplicado en películas biodegradables en la conservación

poscosecha de frutos de aguacate y su efecto en las características organolépticas y fisicoquímicas, o bien la combinación de *Bacillus* spp y extracto metanólico de *P. laevigata*.

También, sería conveniente, realizar la separación y elucidación de los metabolitos secundarios presentes en *P. laevigata* y evaluar su efecto individual, o determinar la existencia de sinergismo entre estos metabolitos sobre la inhibición del crecimiento micelial de *C. fructicola*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, J. U. 2008. DNA sequencing technologies. *Nature Education* 1 (1): 193.
- Afanador-Kafuri, L., A. González, L. Gañan, J. F. Mejía, N. Cardona, and E. Alvarez. 2014. Characterization of *Colletotrichum* species causing anthracnose in Andean blackberry in Colombia. *Plant Disease* 98: 1503-1513.
- Agrios, G. N. 2005. *Plant Pathology*. Fifth Edition. Elsevier Academic Press. USA. 922 p.
- Ahmad, A., K. A. Khan, V. U. Ahmad, and S. Qazi. 1986. Antibacterial activity of Julifrine isolated from *Prosopis juliflora*. *Plant Medica* 52 (4): 285-288.
- Akgül, D. S., Q. N. Awan, P. G. Güler, and N. Önelge. 2016. First report of anthracnose and stem end rot diseases caused by *Colletotrichum gloeosporioides* and *Neofusicoccum australe* on avocado fruits in Turkey. *Plant Disease*.
- Alaniz, S., L. Hernández, and P. Mondino. 2015. *Colletotrichum fructicola* is the dominant and one of the most aggressive species causing bitter root of apple in Uruguay. *Tropical Plant Pathology* 40 (4): 265-274.
- Al-Humaid, A. I., y M. O. A. Warrag. 1998. Allelopathic effects of mesquite (*Prosopis juliflora*) foliage on seed germination and seedlings growth of bermudagrass (*Cynodon dactylon*). *Journal of Arid Environments*, 38 (2): 237-243.
- Ali, A., N. Tabanca, B. Demirci, E. K. Blythe, Z. Ali, K. H. Can Baser, and I. A. Khan. 2015. Chemical composition and biological activity of four *Salvia* essential oils and individual compounds against two species of mosquitoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63 (2): 447-456.

- Al-Reza, S. M., A. Rahman, Y. Ahmed and S. C. Kang. 2010. Inhibition of plant pathogens in vitro and in vivo with essential oil and organic extracts of *Cestrum nocturnum* L. Pesticide Biochemistry and Physiology, 96, 86-92.
- Altschul, S., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI.BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research 25 (17): 3389-3402.
- Alvarez, E., L. Gañan, A. Rojas-Treviño, J. F. Mejía, G. A. Llano, and A. González. 2014. Diversity and pathogenicity of *Colletotrichum* species isolated from soursop in Colombia. European Journal of Plant Pathology 139 (2): 235-338.
- Ángeles-Martínez, O., García-Mateos, M. R., Rodríguez-Pérez, E., Sánchez-Álvarez, E., Soto-Hernández, M. 2011. Toxicidad de extractos vegetales para el control de *Trialeurodes vaporariorum* W. (Homoptera: Aleyrodidae) en laboratorio y en cultivo de tomate en invernadero. The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico 95 (3-4): 117-132.
- Arpaia, M. L., S. Collin, J. Sievert, and D. Obeland. 2015. Influence of cold storage prior to and after ripening on quality factors and sensory attributes of ‘Hass’ avocados. Postharvest Biology and Technology 110: 149-157.
- Arzanlou, M., M. Bakhshi, K. Karimi, and M. Torbati. 2015. Multigene phylogeny reveals three new records of *Colletotrichum* spp. and several new host records for the mycobiota of Iran. Journal of Plant Protection Research 55 (2): 198-211.

- Ashwini, N., and S. Srividya. 2014. Potentiality of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent for management of anthracnose disease of chilli caused by *Colletotrichum gloeosporioides* OGC1. 3 Biotech 4 (2): 127-136.
- Bajpai, V. K. Shukla, S., Kang, S. C. 2008. Chemical composition and antifungal activity of essential oil and various extract of *Silene armeria* L. Bioresour Technol 99 (18): 8903-8908.
- Barkai-Golan, R. 2001. Postharvest diseases of fruits and vegetables, development and control. ELSEVIER. The Netherlands. 418 p.
- Barrera-Necha, L. y Bautista, B. S. (2008). Actividad Antifúngica de Polvos, Extractos y Fracciones de *Cestrum nocturnum* L. Sobre el crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. Revista Mexicana de Fitopatología, 26 (1), 27-31.
- Bautista, B. S., Barrera, N. L., Hernández, L. A., Velázquez, V. M.; Alia, T. I. y Guillén, S. D. (2008). Polvos, extractos y fracciones de hojas de *Cestrum nocturnum* L. y su actividad antifúngica en dos aislamientos de *Fusarium spp.* Revista UDO Agrícola, 8 (1), 42-51.
- Bautista, B. S., Sivakumar D., Bello, P. A., Villanueva, A. R. y Hernández, L. M. (2013). A review of the management alternatives for controlling fungi on papaya fruit during the postharvest supply chain. Crop Protection 49: 8-20.
- Bazie, S., Ayalew, A., Woldetsadik, K. 2014a. Antifungal activity of some plant extracts against (*Colletotrichum Musae*) the cause of postharvest banana anthracnose. Plant Pathology & Microbiology 5:2

- Bazie, S., A. Ayalew, and K. Woldetsadik. 2014b. Integrated management of postharvest banana anthracnose (*Colletotrichum musae*) through plant extracts and hot water treatment. *Crop Protection* 66: 14-18.
- Barrera, N. L., Basutista, B. S., Flores, M. H. y Rojas, E. A. (2008). Efficacy of essential oils on the conidial germination, growth of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc and control of postharvest diseases in papaya (*Carica papaya* L.). *Plant Pathology Journal* 7 (2): 174-178.
- Bernard, C. B. y Philogene, B. J. R. 1993. Insecticide synergists role, importance in perspectives. *Journal Toxicol Environmental Health* 38: 199 -223.
- Bill, M., Sivakumar, D., Korsten, L., Thompson, A. K. 2014. The efficacy of combined application of edible coatings and thyme oil in inducing resistance components in avocado (*Persea americana* Mill.) against anthracnose during post-harvest storage. *Crop Protection*, 64: 159-167.
- Bosquez, M. E., Ronquillo J. E., Bautista, B. S., Verde, C. J., Morales, L. J. (2010). Inhibitory effect of essential oils against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Rhizopus stolonifer* in stored papaya fruit and their possible application in coatings. *Postharvest Biology and Technology*, 57, 132–137.
- Bragança, C. A. D., L. L. Silva, F. Haddad, and S. A. S. Oliveira. 2016. First report of *Colletotrichum fruticola* causing anthracnose in cassava (*Manihot esculenta*) in Brazil. *Plant Disease* 100 (4): 857.
- Bridges, J. R. 1987. Effects of terpenoid compounds on growth of symbiotic fungi associated with the southern pine beetle. *Phytopathology* 77: 83-85.

- Burrows, G. E. y Tyrl, R. J. (2013). Toxic Plants of North America. EUA. Segunda edición. John Wiley & Sons, Inc. 1308 p.
- Cai, L., K. D. Hyde, P. W. J. Taylor, B. S. Weir, J. M. Waller, M. M. Abang, J. Z. Zhang, Y. L. Yang, S. Phoulivong, Z. Y. Liu, H. Prihastuti, R. G. Shivas, E. H. C. McKenzie, and P. R. Johnston. 2009. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. Fungal Diversity 39: 183-204.
- Campos-Martínez, A., Velázquez-del Valle, M. G., Flores-Moctezuma, H. E., Suárez-Rodríguez, R., Ramírez-Trujillo, J. A. Hernández-Lauzardo, A. N. 2016. Antagonistic yeasts with potential to control *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. and *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds on avocado fruits. Crop Protection 89: 101–104.
- Capote, N., A. M. Patrana, A. Aguado, and P. Sánchez-Torres. 2012. Molecular tools for detection of plant pathogenic fungi and fungicide resistance. In: Plant Pathology. C. J. Cumagun (Ed.). InTech. Rijeka, Croatia. pp: 150-202.
- Carrillo, A., Mayer, I., Koch, G. y Hapla, F. 2008. Wood anatomical characteristics and chemical composition of *Prosopis laevigata* grown in the northeast of Mexico. IAWA Journal 29 (1): 25–34.
- Castillo, F., D. Hernández, G. Gallegos, R. Rodríguez, and C. N. Aguilar. 2012. Antifungal properties of bioactive compounds from plants. In: Fungicides for plant and animal diseases. D. Dhanasekaran (Ed.). INTECH. pp: 81-106

- Celis, A., Mendoza, C., Pachón, M., Cardona, J., Delgado, W. y Cuca, L. E. (2008). Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia *Piperaceae*. Una revisión. *Agronomía Colombiana*, 26(1), 97-106.
- Chen, H., X. Xiao, J. Wang, L. Wu, Z. Zheng, and Z. Yu. 2008. Antagonistic effects of volatiles generated by *Bacillus subtilis* on spore germination and hyphal growth of the plant pathogen, *Botrytis cinerea*. *Biotechnology Letters* 30 (5): 919-923.
- Chirinos, J. 2009. Uso de extractos naturales como una alternativa ecológica para el control de enfermedades en plantas. Aspectos fitosanitarios. INIA Divulga. Venezuela. pp. 40-42.
- Choudhary, D. K., and B. N. Johri. 2009. Interactions of *Bacillus* spp. and plants – with special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiological Research* 164 (5): 493-513.
- Coates, L.M., Willingham, S.L., Pegg, K.G., Cooke, A.W., Dean, J. and Langdon, P.W.B. 2001. Field and postharvest management of avocado fruit diseases. *In*: Proceedings of the Australian and New Zealand Avocado Growers' Conference 'Vision 2020'. Australian Avocado Growers' Federation Brisbane, Session 3/7 p. 11.
- Cooke, T., D. Persley, and S. House. 2009. Diseases of Fruit Crops in Australia. CSIRO Publishing Ltd. Australia. 276 p.
- CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad). 2016. *Phytolacca icosandra* L. En línea: <http://www.conabio.gob.mx/>
- Cowan, M. M. 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12 (4): 564–582.

- Damian, B. L. M., Espinosa, M. R. M., Martínez, M. R. E., Ron, E. O. A., Salgado, G. R., Flores, G. A., Raya, G. D. y Martínez, P. M. 2008. The mexican medicinal plants with antifungal properties are an economic and health opportunity area. *Pharmacologyonline* 3: 61-77.
- Dann, E. K., R. C. Ploetz, L. M. Coates, and K. G. Pegg. 2013. Foliar, fruit and soilborne diseases. In. *The Avocado: Botany, Production and Uses*. Second Edition. Pp: 380-422. B. Schaffer, B. N. Wolstenholme, A. W. Whiley (Eds). CAB International.
- De Bellaire, L. L., and C. Dubois. 1997. Distribution of thiabendazol-resistant *Colletotrichum musae* isolates from Guadeloupe banana plantations. *Plant Disease* 81: 1378-1383.
- De Jesús-Gavino, A. F., P. Mendoza-de Gives, D. O. Salinas-Sánchez, M .E. López-Arellano, E. Liébano-Hernández, V. M. Hernández-Velázquez, G. Valladares-Cisneros. *Jorunal of Helminthology* 84 (1): 71-75.
- Dean, R., Van Kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond, K. K., Di Pietro, A., Spanu, P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J. y Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(4), 414–430.
- Delgado, B. E., García, M. M., Ybarra, M. M., Luna, M. C., Martínez, D. M. (2012). Propiedades entomotóxicas de los extractos vegetales de *Azardichta indica*, *Piper auritum* y *Petiveria alliacea* para el control de *Spodoptera exigua* Hübner. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 18(1), 55-69.
- Delp, C. J. 1980. Coping with resistance to plant disease. *Plant Disease* 64 (7): 652-657.

- Deressa, T., F. Lemessa, and M. Wakjira. 2015. Antifungal activity of some invasive alien plant leaf extracts against mango (*Mangifera indica*) anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. International Journal of Pest Management, 61 (2): 99-105.
- Dimetry, N. Z. 2014. Different Plant Families as Bioresource for Pesticides. Advances in Plant Biopesticides. Springer India. pp 1-20.
- Diaz, M. M. A. 2016. Actividad antifúngica y fitotóxica de los extractos vegetales de *Tulbaghia violácea*, *Piper auritum*, *Capsicum chinense*, *Raphanus sativus*, *Brassica napobrassica*, *Dieffenbachia amoena*, *Neriun oleander*. Tesis Doctorado. Instituto de Horticultura. Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, México.
- Doyle, J. J., and J. L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15.
- Droby, S., Wisniewski, I. M., Benkeblia, N. 2011. Postharvest pathology of tropical and subtropical fruit and strategies for decay control. Postharvest pathology and decay control. pp.195-293.
- Ehteshamul-Haque, S., Javed, Z.M., Vahidy, A. A., Ghaffar, A. 1998. Effect of organic amendments on the efficacy of pseudomonas aeruginosa in the control of root rot disease of sunflower. Pakistan Journal Bot 30 (1): 45-50.
- Elangbam, P. D., Deepshikha, Kumari¹, B., Shivani. 2015. Review on Prospects of Pre-harvest Application of Bioagents in Managing Post-Harvest Diseases of Horticultural Crops. International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology 8 (4):933-041.
- Eloff, J. N. 1997. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants?. Journal of Ethnopharmacology 60: 1- 8.

- Everett, K. R. 2003. The effect of low temperature on *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides* causing body rots of avocados in New Zealand. *Australasian Plant Pathology* 32: 441-448.
- Everett, K. R., L. M. Boyd, H. A. Pak, and J. G. M. Cutting. 2007. Calcium, fungicide sprays and canopy density influence postharvest rots of avocado. *Australasian Plant pathology* 36: 22-31.
- Exarchou, V., Kanetis, L., Charalambous, Z., Apers, S., Pieters, L., Gekas, V. y Goulas, V. 2015. HPLC-SPE-NMR Characterization of Major Metabolites in *Salvia fruticosa* Mill. Extract with Antifungal Potential: Relevance of Carnosic Acid, Carnosol, and Hispidulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63: 457–463.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits of phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791. <http://www.jstor.org/stable/2408678>
- Food and Agriculture Organization of The United Nations Statistics Division. (2013). Consultado el 04 de enero de 2016 en <http://faostat3.fao.org>
- Freeman, S., T. Katan, and E. Shabi. 1998. Characterization of *Colletotrichum species* responsible for anthracnose diseases of various fruits. *Plant Disease* 82 (6): 596-605.
- Fu, D., W. Wang, R. Qin, R. Zhang, G. Sunb, and M. L. Gleason. 2013. *Colletotrichum fructicola*, first record of bitter rot of apple in China. *Mycotaxon* 126: 23-30.
- Gallegos-Infante, J. A., Rocha-Guzmán, N. E., González-Laredo, R. F. y García-Casas, M. A. 2013. Efecto del procesamiento térmico sobre la capacidad antioxidante de pinole a base de vainas de mezquite (*Prosopis laevigata*). *CyTA Journal of Food* 11 (2): 162–170.

- Gang, G. H., H. J. Cho, H. S. Kim, Y. B. Kwack, and Y. S. Kwak. 2015. Analysis of fungicide sensitivity and genetic diversity among *Colletotrichum* species in sweet persimmon. *Plant Pathology Journal* 31 (2): 115-122.
- Gañán, L., E. Álvarez y Z. J. Castaño. 2015. Identificación genética de aislamientos de *Colletotrichum spp.* causantes de antracnosis en frutos de aguacate, banano, mango y tomate de árbol. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 39(152), 339-347.
- García-Andrade, M., R. F. González-Laredo, N. E. Rocha-Guzmán, J. A. Gallegos-Infante, M. Rosales-Castro, and L. Medina-Torres. 2013. Mesquite leaves (*Prosopis laevigata*), a natural resource with antioxidant capacity and cardioprotection potential. *Industrial Crops and Products*, 44: 336-342.
- Goel, M., S. Maurya, V. P. Pandey, V. P. Singh, A. K. Singh, and U. P. Singh. 2002. Effect of Ent-norsecurinine, an alkaloid, on spore germination of some fungi. *Mycobiology* 30 (4): 225-227.
- González-Chávez, M. C., R. Carrillo-González, and M. C. Gutiérrez-Castorena. 2009. Natural attenuation in a slag heap contaminated with cadmium: The role of plants and arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of Hazardous Materials* 161: 1288-1298.
- Grisi, P. U., M. R. Forim, E. S. Costa, S. Anese, M. F. Franco, M. N. Eberlin, and S. C. J. Gualtieri. 2015. Phytotoxicity and identification of secondary metabolites of *Sapindus saponaria* L. leaf extract. *Journal of Plant Growth Regulation* 34 (2): 339-349.

- Guarnaccia, V., A. Vitale, G. Cirvilleri, D. Aiello, A. Susca, F. Epifani, G. Perrone, and G. Polizzi. 2016. Characterisation and pathogenicity of fungal species associated with branch cankers and stem-end rot of avocado in Italy. *European Journal of Plant Pathology*. 1-14.
- Gurjar, M. S., S. Ali, M. Akhtar, and K. S. Singh. 2012. Efficacy of plant extracts in plant disease management. *Agricultural Sciences* 3: 425-433.
- Hall, T. 2004. BioEdit version 7.0.0. Isis Pharmaceuticals, Inc. 192 p.
- Han, J. H., Shim, H., Shin, J. H. Kim, K. S. 2015. Antagonistic Activities of *Bacillus* spp. Strains Isolated from Tidal Flat Sediment Towards Anthracnose Pathogens *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* in South Korea. *Plant Pathol Journal* 31 (2): 165-175.
- Hernández-Albíter, R., Barrera, N. L., Bautista, B. S. y Bravo, L. L. (2007). Antifungal potential of crude plant extracts on conidial germination of two isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 25 (2), 180-185.
- Hernández, M., Murace, M., Ringuelet, J.; Petri, I., Gallo, D., Arambarri, A. 2013. Effect of aqueous and alcohol extracts of *Phytolacca tetramera* (Phytolaccaceae) leaves on *Colletotrichum gloeosporioides* (Ascomycota). *Boletín de Sociedad Argentina de Botánica* 48 (2): 201-209.
- Hernández-Lauzardo, A. N., A. Campos-Martínez, M. G. Velázquez-del Valle, H. Flores-Moctezuma, R. Suárez-Rodríguez, and J. A. Ramírez-Trujillo. 2015. First report of

- Colletotrichum godetiae* causing anthracnose on avocado in Mexico. Plant Disease 99 (4): 555.
- Hernández-Lauzardo, A. N., Bautista-Baños, S., Velázquez del Valle, M. G. 2007. Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades postcosecha hortofrutícolas. Revista Fitotecnia Mexicana 30 (2): 119-123.
- Hernández-Villegas, M. M., R. Borges-Argáez, R. I. Rodríguez-Vivas, J. F. J. Torres-Acosta, M. Méndez-González, and M. Cásaes-Farfan. 2012. *In vivo* anthelmintic activity of *Phytolacca icosandra* against *Haemonchus contortus* in goats. Veterinary Parasitology 189: 284-290.
- Hernández-Villegas, M. M., R. Borges-Argáez, R. I. Rodríguez-Vivas, J. F. J. Torres-Acosta, M. Méndez-González, and M. Cásaes-Farfan. 2011. Ovicidal and larvicidal activity of the crude extracts from *Phytolacca icosandra* against *Haemonchus contortus*. Veterinary Parasitology 179: 100-106.
- Higgs, P. G., and T. K. Attwood. 2005. Bioinformatics and Molecular Evolution. Blackwell Publishing. UK. 398 p.
- Hofman, P. J., B. A. Stubbings, M. F. Adkins, G. F. Meiburg, and A. B. Woolf. 2002a. Hot water treatments improve 'Hass' avocado fruit quality after cold disinfestation. Postharvest Biology and Technology 24: 183-192.
- Hofman, P. J., S. Vuthapanich, A. W. Whiley, A. Klieber, and D. H. Simons. 2002b. Tree yield and fruit minerals concentrations influence *Hass* avocado fruit quality. Scientia Horticulturae 92: 113-123.

- Ippolito, A., and F. Nigro. 2000. Impact of preharvest application of biological agents on postharvest diseases of fresh fruits and vegetables. *Crop Protection* 19 (8): 715-723.
- Iwasa, K., M. Moriyasu, and B. Nader. 2000. Fungicidal and herbicidal activities of berberine related alkaloids. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 64: 1998-2000.
- Janisiewicz, W. J., Conway, W. S. 2010. Combining biological control with physical and chemical treatments to control fruit decay after harvest. *Stewart Postharvest Rev.* 10: 1–3.
- Jasso, R. D., Rodríguez, G. R., Hernández, C. F., Aguilar, G. C.; Sáenz, G. A.; Villarreal, Q. J.; Moreno, Z. L. (2011). *In vitro* antifungal activity of extracts of Mexican Chihuahuan Desert plants against postharvest fruit fungi. *Industrial Crops and Products*, 34, 960–966.
- Jat, R. G., Goyal, S. K., Choudhary, S. 2013. Management of *Aspergillus* and blue mould rot of anola fruits. *Asian Journal of Bio Science*, 8 (1):91-93.
- Javaid, A., and M. Amin. 2009. Antifungal activity of methanol and n-hexane extracts of three *Chenopodium* species against *Macrophomina phaseolina*. *Natural Product Research* 23 (12): 1120-1127.
- Jiang, J., H. Zhai, H. Li, Z. Wang, Y. Chen, N. Hong, G. Wang, G. N. Chofong, and W. Xu. 2014. Identification and characterization of *Colletotrichum fructicola* causing black spots on young fruits related to bitter rot of pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) in China. *Crop Protection* 58: 41-48.
- Jing, Z., Li-Ting, Y., En-Lin, Y., Hai-Xin, D., Huo-Chun, Y., Zheng-Ke, Z., Chao, Y., Ying-Qian, L. y Gang, F. (2014). Antifungal Activity of Compounds Extracted from Cortex

- Pseudolaricis* against *Colletotrichum gloeosporioides*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 62, 4905–4910.
- Joa, J. H., C. K. Lim, I. Y. Choi, M. J. Park, and H. D. Shin. 2016. First report of *Colletotrichum fructicola* causing anthracnose on mango in Korea. Plant Disease
- Johnston, P. R., and D. Jones. 1997. Relationship among *Colletotrichum* isolates from fruit-rots assessed using rDNA sequences. Mycologia 89: 420-430.
- Juárez-Vázquez, M. C., C. Carranza-Álvarez, A. J. Alonso-Castro, and E. Solano. 2013. Ethnobotany of medicinal plants used in Xalpatlahuac, Guerrero, Mexico. Journal of Ethnopharmacology 148 (2): 521-527.
- Kassim, A., Workneh, T. S., Bezuidenhout, C. N. 2013. A review on postharvest handling of avocado fruit. African Journal of Agricultural Research 8(21): 2385-2402.
- Khan, M. A., Inayat, H.; Khan, H., Saeed, M., Khan, I. y Inayat-Ur, R. (2011). Antimicrobial activities of the whole plant of *Cestrum nocturnum* against pathogenic microorganisms. African Journal of Microbiology Research, 5(6), 612-616.
- Kishore, K. y Pande, S. 2005. Integrated management of late leaf spot and rust diseases of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) with *Prosopis juliflora* leaf extract and chlorothalonil. International Journal of Pest Management 51(4): 325 – 332.
- Korsten, L., E. S. de Jager, E. E. De Villiers, A. Lourens, J. M. Kotzé and F. C. Wehner. 1995. Evaluation of bacterial epiphytes isolated from avocado leaf and fruits surfaces for biocontrol of avocado postharvest diseases. Plant Diseases 79: 1149-1156.
- Kumar S, Stecher G and Tamura K. 2015. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0. Molecular Biology and Evolution (Submitted). <http://www.kumarlab.net/publications>

- Lakshmi, B. S., Naidu, K. C., Murthy, Y. L. N., Bobbarala, V., Pandit, N. 2010. Bio-efficacy of some medicinal plants against pathogens of cereal crops and phytochemical examination of *Prosopis juliflora* (Sw) Dc. *Journal of Pharmacy Research*, 3 (2): 356.
- Landero, V. N., Nieto, A. D., Téliz, O. D.; Alatorre, R. R.; Orozco, S. M. y Ortiz, G. C. (2013). Potencial antifúngico de extractos de cuatro especies vegetales sobre el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* en papaya (*Carica papaya*) en poscosecha. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 4 (1), 47-62.
- Li, P. L., D. Liu, G. S. Gong, S. R. Chen, X. X. Yang. 2016. First report of *Colletotrichum fructicola* causing anthracnose on *Aucuba japonica* in Sichuan Province of China. *Plant Disease* 100 (5): 1019.
- Lima, N. B., M. V. A. Batista, M. A. de Moraes Jr., M. A. G. Barbosa, S. J. Michereff, K. D. Hyde, M. P. S. Câmara. 2013. Five *Colletotrichum* species are responsible for mango anthracnose in northeastern Brazil. *Fungal Diversity* 61 (1): 78-88.
- Lima, N. B., W. G. Lima, J. M. Tovar-Pedraza, S. J. Michereff, and M. P. S. Câmara. 2015. Comparative epidemiology of *Colletotrichum* species from mango in northeastern Brazil. *European Journal of Plant Pathology* 141: 679-688.
- Liu, F., B. S. Weir, U. Damm, P. W. Crous, Y. Wang, B. Liu, M. Wang, M. Zhang, and L. Cai. 2015. Unravelling *Colletotrichum* species associated with *Camellia*: employing ApMat and GS loci to resolve species in *C. gloeosporioides* complex. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 35: 63-86.
- Mahasneh, A. M., J. A. Abbas, and A. A. El-Oqlah. 1996. Antimicrobial activity of extracts of herbal plants used in the traditional medicine of Bahrain. *Phytotherapy Research* 10: 251-253.

- Marques, J. R., P. J. Hofman, and A. H. Wearing. 2006. Between-tree variation in fruit quality and fruit mineral concentrations of *Hass* avocados. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 46: 1195-1201.
- McCartney, H. A., S. J. Foster, B. A. Fraaije, and E. Ward. 2003. Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. *Pest Management Science* 59: 129-142.
- McMillan, R. T. and K. R. Narayanan. 1990. Effectiveness of chemical postharvest treatments for avocado anthracnose control. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 103: 232-233.
- Mendieta, B., J. A. Olaeta, R. Pedreschi, and P. Undurraga. 2016. Reduction of cold damage during cold storage of *Hass* avocado by a combined use of pre-conditioning and waxing. *Scientia Horticulturae* 200: 119-124.
- Menge, J. A., and R. C. Ploetz. 2003. Diseases of avocado. In: *Diseases of Tropical Fruits*. R. C. Ploetz (Ed). Pp: 35-71. CAB International.
- Metzker, M. L. 2005. Emerging technologies in DNA sequencing. *Genome Research* 15: 1767-1776.
- Meazza, G., Dayan, F.E., Wedge, D.E. 2003. Activity of quinones on *Colletotrichum* species. *J Agri Food Chem.* 51:3824-3828.
- Möller, E. M., G. Bahnweg, H. Sandermann, and H. H. Geiger. 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Research*, 20: 6115-6116.
- Moreira, R. R., C. N. Nesi, and L. L. M. De Mio. 2014. *Bacillus* spp. and *Pseudomonas putida* as inhibitors of the *Colletotrichum acutatum* group and potential to control Glomerella leaf spot. *Biological Control* 72: 30-37.

- Muirhead, I. F., R. D. Fitzell, R. D. Davis and R. A. Peterson. 1982. Post-harvest control for anthracnose and stem-end rots of Fuerte avocados with porchloraz and other fungicides. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry* 22: 441-446.
- Nam, M. H., M. S. Park, H. D. Lee, and S. H. Yu. 2013. Taxonomic re-evaluation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from strawberry in Korea. *Plant Pathology Journal* 29 (3): 317-322.
- NCBI (National Center of Biotechnology Information), 2016. US National Library of Medicine. USA. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Nkomo, M. M., D. D. R. Katerere, H. H. F. Vismer, T. T. Cruz, S. S. Balayssac, M. M. Malet-Martino, and N. N. P. Makunga. 2014. Fusarium inhibition by wild populations of the medicinal plant *Salvia africana-lutea* L. linked to metabolomic profiling. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 14: 99.
- Niu, X., H. Gao, J. Qi, M. Chen, A. Tao, J. Xu, Z. Dai, and J. Su. 2016. *Colletotrichum* species associated with jute (*Corchorus capsularis* L.) anthracnose in southeastern China. *Scientific Reports* 6.
- Noor, M. A. F., Zimmerman, K. J., Teeter, K. C. 2006. Data Sharing: How Much Doesn't Get Submitted to GenBank?. *Plos Biology*, 4 (7): 228.
- Oliva, A., K. M. Meepagala, D. E. Wedge, D. Harries, A. L. Hale, G. Aliotta, and S. O. Duke. 2003. Natural fungicides from *Ruta graveolens* L. leaves, including a new quinolone alkaloid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 890-896.

- Padrón-Márquez, B., E. Viveros-Valdez, A. Oranday-Cárdenas, and P. Carranza-Rosales. 2012. Antifungal activity of *Psidium guajava* organic extracts against dermatophytic fungi. *Journal of Medicinal Plants Research* 6: 5435-5438.
- Peligrini, D. D., J. K. Tsuzuki, C. A. B. Amado, D. A. G. Cortez, and I. C. P. Ferreira. 2008. Biological activity and isolated compounds in *Sapindus saponaria* L. and other plants of the genus *Sapindus*. *Latin American Journal of Pharmacy* 27 (6): 922-927.
- Peng, L. J., T. Sun, Y. L. Yang, L. Cai, K. D. Hyde, A. H. Bahkali, Z. Y. Liu. 2013. *Colletotrichum* species on grape in Guizhou and Yunnan provinces, China. *Mycoscience* 54 (1): 29-41.
- Peng, L. J., Y. Yang, K. D. Hyde, A. H. Bahkali, and Z. Liu. 2012. *Colletotrichum* species on *Citrus* leaves in Ghizhou and Yunnan Provinces, China. *Cryptogamie, Mycologie* 33 (3): 267-283.
- Pérez-García, A., D. Romero, and A. de Vicente. 2011. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. *Current Opinion in Biotechnology* 22: 187-193.
- Pesis, E., M. Ackerman, R. Ben-Arie, O. Feygenberg, X. Feng, A. Apelbaum, R. Goren, and D. Prusky. 2002. Ethylene involvement in chilling injury symptoms of avocado during cold storage. *Postharvest Biology and Technology* 24: 171-181.
- Phoulivong, S., E. H. C. McKenzie, and K. D. Hyde. 2012. Cross infection of *Colletotrichum* species; a case study with tropical fruits. *Current Research in Environmental & Applied Mycology* 2 (2): 99-111.

- Phoulivong, S., L. Cai, H. Chen, E. H. C. McKenzie, K. Abdelsalam, E. Chukeatirote, and K. D. Hyde. 2010. *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. *Fungal Diversity* 44: 33-43.
- Porras, M. F. and A. López-Ávila. 2009. Effect of extracts from *Sapindus saponaria* on the glasshouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Revista Colombiana de Entomología* 35 (1): 7-11.
- Prabha, D. S., H. U. Dahms, and P. Malliga. 2014. Pharmacological potentials of phenolic compounds from *Prosopis* spp.-a review. *Journal of Coastal Life Medicine* 2 (11): 918-924.
- Prihastuti, H., L. Cai, H. Chen, E. H. C. McKenzie, and K. D. Hyde. 2009. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. *Fungal Diversity* 39: 89-109.
- Prober, J. M., G. L. Trainor, R. J. Dan, F. W. Hobbs, C. W. Robertson, R. J. Zagursky, A. J. Cocuzza, M. A. Jensen, and K. Baumeister. 1987. A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-termination dideoxynucleotides. *Science*, 238: 336-341.
- Prusky, D. 1996. Pathogen quiescent in postharvest diseases. *Annual Review of Phytopathology* 34: 413-434.
- Prusky, D., and A. Lichter. 2007. Activation of quiescent infections by postharvest pathogens during transition from the biotrophic to the necrotrophic stage. *FEMS Microbiology Letters* 268 (1): 1-8.

- Punnawich, Y.; Montree, I.; Warin, I. y Kan, C. (2010). Fungicidal activity of compounds extracted from the pericarp of *Areca catechu* against *Colletotrichum gloeosporioides* *in vitro* and in mango fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 55, 129-132.
- Raghavendra, M. P., S. Satish, and K. A. Raveesha. 2009a. Alkaloids isolated from leaves of *Prosopis juliflora* against *Xanthomonas* pathovars. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 42 (11): 1033-1041.
- Raghavendra, M. P., S. Satish, and K. A. Raveesha. 2009b. Alkaloid extracts of *Prosopis juliflora* (Sw.) DC. (Mimosaceae) against *Alternaria alternata*. *Journal of Biopesticides*, 2 (1): 56-59.
- Rajendran, R., Lakshmi, P. A. 2016. Green Synthesis of AgNPs, characterization and antibacterial activity from *Salvia Leucantha* Cav. Plant Aqueous Extract. *International Journal of Science and Research* 5 (7): 1515 – 1519.
- Ramdial, H., and S. N. Rampersad. 2015. Characterization of *Colletotrichum* spp. causing anthracnose of bell pepper (*Capsicum annuum* L.) in Trinidad. *Phytoparasitica* 43 (1): 37-43.
- Ramírez-Arteaga, M., M. G. Valladares, and J. G. González-Rodríguez. 2013. Use of *Prosopis laevigata* as a corrosion inhibitor for Al in H₂SO₄. *International Journal of Electrochemical Science* 8: 6864-6877.
- Rampersad, S. N., Teelucksingh, L. D. 2012. Differential Responses of *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. truncatum* Isolates from Different Hosts to Multiple Fungicides Based on Two Assays. *Plant Disease* 96 (10): 1526-1536.

- Rashed, K., A. Ćirić, J. Glamočlija, R. C. Calhelha, I. C. F. R. Ferreira, and M. Soković. 2013a. Antimicrobial activity, growth inhibition of human tumour cells lines, and phytochemical characterization of the hydromethanolic extract obtained from *Sapindus saponaria* L. aerial parts. BioMed Research International.
- Rashed, K., M. T. Luo, L. T. Zhang, and Y. T. Zheng. 2013b. Phytochemical content and anti-HIV-1 activity of *Sapindus saponaria* L. Journal of Forest and Industries 2 (4): 22-26.
- Ravneel, P. R., Anamika, A. 2015. Effects of Plant Leaf Extract against *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Sac. Causing Post-Harvest Disease of Papaya. Journal of Agricultural Science 7 (5): 195- 198.
- Ribeiro, A., C. L. Zani, T. M. Almeida-Alves, N. M. Mendes, M. Hamburger, and K. Hostettmann. 1995. Molluscicidal saponins from the pericarp of *Sapindus saponaria*. International Journal of Pharmacognosy 33 (3): 177-180.
- Rodríguez, L. E., Cárdenas, S. E., Hernández, D. S., Gutiérrez, D. A.; Mayek, P. N. (2013). Análisis de la infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (penz.) penz. & sacc. de frutos de aguacatero. Bras. Frutic., Jaboticabal, 2, 898-905.
- Rodríguez-Vázquez, R., S. Sánchez, X. Mena-Espino, and M. A. Amezcua-Allieri. 2016. Identification of the medicinal plant species with the potential for remediation of hydrocarbons contaminated soils. Acta Physiologiae Plantarum 38: 23.
- Roth, I., and H. Lindorf. 2002. South American Medicinal Plants: Botany, Remedial, Properties, and General Use. SPRINGER. New York, USA. 492 p.

- SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2014. Aumentan exportaciones de aguacate 29 por ciento al primer semestre. En línea: <http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/2012/Paginas/2014B615.aspx#>
- Sahin, F., I. Karaman, M. Güllüce, H. Ögütçü, M. Sengül, A. Adigüzel, S. Öztürk, and R. Kotan. 2003. Evaluation of antimicrobial activities of *Saureja hortensis* L. Journal of Ethnopharmacology 87: 61-65.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, H. A. Erlich. 1987. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, 239: 487-491.
- Sanders, G. M., L. Korsten, and F. C. Wehner. 2000. Survey of fungicide sensitivity in *Colletotrichum gloeosporioides* from different avocado and mango production areas in South Africa. European Journal of Plant Pathology 106: 745-752.
- Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academic of Science of the United States of America, 74 (12): 5463-5467.
- Satish, S., D. C. Mohana, M. P. Raghavendra, and K. A. Raveesha. 2007. Antifungal activity of some plant extracts against important seed borne pathogens of *Aspergillus* sp. Journal of Agricultural Technology 3 (1): 109-119.
- Sharma, R. R., Singh, D., Singh, R. 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. Biological Control 50: 205-221.
- Sharma, G., and B. D. Shenoy. 2014. *Colletotrichum fructicola* and *C. siamense* are involved in chilli anthracnose in India. Archives of Phytopathology and Plant Protection 47 (10): 1179-1194.
- Sharma, G., N. Kumar, B. S. Weir, K. D. Hyde, and B. D. Shenoy. 2013. The ApMat marker can resolve *Colletotrichum* species: a case study with *Mangifera indica*. Fungal Diversity 61 (1): 117-138.

- SIAP (Servicio de Información agroalimentaria y pesquera). 2014. En línea: www.siap.gob.mx. Consultado el 20 de marzo 2016.
- Silva-Rojas, H. V., and G. D. Ávila-Quezada. 2011. Phylogenetic and morphological identification of *Colletotrichum boninense*: a novel causal agent of anthracnose in avocado. *Plant Pathology* 60: 899-908.
- Singh, A., S. Singh, S. Singh, T. D. Singh, V. P. Singh, V. B. Pandey, and U. P. Singh. 2009. Fungal spore germination inhibition by alkaloids dehydrocorydalmine and oxyberberine. *Journal of Plant Protection Research* 49 (3): 287-289.
- Somesh, S., Ashok, K. T., Ratikanta, M. 2016. Post-harvest Technology for Reducing Stress on Bioresource: Recent Advances and Future Needs. *Bioresource and Stress Management*. pp 229-256
- Sridharan, G., P. Brindha, R. Raja, and R. A. Priya. 2011. In-vitro and in-vivo cytotoxic effect of *Salvia leucantha* Cav. Against EAC cell lines. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 4: 143-146.
- Stein, T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, synthesis and specific functions. *Molecular Microbiology* 56 (4): 845-857.
- Stewart, J. E., Timmer, L. W., Lawrence, C. B., Pryor, B.M., Peever, T. L. 2014. Discord between morphological and phylogenetic species boundaries: incomplete lineage sorting and recombination results in fuzzy species boundaries in an asexual fungal pathogen. *BMC Evolutionary Biology* 14(1): 38.
- Talibi, I., Boubaker, H., Boudyach, E. H., Ait Ben Aoumar, A. 2014. Alternative methods for the control of postharvest citrus diseases. *Journal of Applied Microbiology*, 1-17

- Thakur, R., Singh, R., Saxena, P. and Mani, M. 2014. Evaluation of antibacterial activity of *Prosopis juliflora* (sw.) Dc. Leaves. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines 11(3):182-188
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipsski, and S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30 (12): 2725-2729.
- Temesgen, D. Fikre, L. y Mulatu, W. 2015. Antifungal activity of some invasive alien plant leaf extracts against mango (*Mangifera indica*) anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. International Journal of Pest Management 61(2): 99-105.
- Thompson JD, Higgins DG and Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research 22:4673-4680. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
- Treyvaud, V., Marston, A., Dyatmiko, W., Hostettmann, K. 2000. Molluscicidal saponins from *Phytolacca icosandra*. Phytochemistry 55: 603-609.
- Tripathi, P. and Dubey, N. 2003. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. Postharvest Biol Technol 32, 235–245.
- Udayanga, D., D. S. Manamgoda, X. Liu, E. Chukeatirote, and K. D. Hyde. 2013. What are the common anthracnose pathogens of tropical fruits? Fungal Diversity 61 (1): 165-179.
- Velázquez-del Valle, M. G., A. Campos-Martínez, H. E. Flores-Moctezuma, R. Suárez-Rodríguez, J. A. Ramírez-Trujillo, A. N. Hernández-Lauzardo. 2016. First report of

- avocado anthracnose caused by *Colletotrichum karstii* in Mexico. *Plant Disease* 100 (2): 534.
- Vieira, W. A. S., A. J. Michereff, M. A. de Moraes Jr., K. D. Hyde, M. P. S. 2014. Câmara. Endophytic species of *Colletotrichum* associated with mango in northeastern Brazil. *Fungal Diversity* 67 (1): 181-202.
- Wang, S., H. R. Kim, J. Kim, J. H. Park, S. B. Lee, S. R. Cheong, and H. T. Kim. 2010. Sensitivity of *Colletotrichum* spp. isolated from grapes in Korea to carbendazim and the mixture of carbendazim plus diethofencarb. *Plant Pathology Journal* 26 (1): 49-56.
- Wang, T. Y., L. Wang, J. H. Zhang and W. H. Dong. 2011. A simplified universal genomic DNA extraction protocol suitable for PCR. *Genetics and Molecular Research* 10 (1): 519-525.
- Wang, H. C., Y. F. Huang, Q. Chen, M. S. Wang, H. Q. Xia, S. H. Shang, and C. Q. Zhang. 2016. Anthracnose caused by *Colletotrichum fructicola* on tobacco (*Nicotiana tabacum*) in China. *Plant Disease* 100 (6): 1235.
- Wagner, H., Bladt, S. 1996. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*. 2d. Ed. Springer Verlag. New York. 384 p.
- Weir, B. S., P. R. Johnston, and U. Damm. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology* 73: 115-180.
- White, J. T., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In: PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*. Innis, A. M., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White (Eds.). Academic Press, Inc. USA. pp: 315-322.

- Williams, L. A. D., Rosner, H. J., Conrad, W., Moller, U., Beifuss, K., Chiba, J., Nkurunziza, P. and Kraus, W. 2002. Selected secondary metabolites from Phytolaccaceae and their biological/pharmaceutical significance. Recent Research Development Phytochemical 6:13-68.
- Willingham, S. L., K. G. Pegg, J. M. Anderson, A. W. Cooke, J. R. Dean, F. R. Giblin, and L. M. Coates. 2006. Effects of rootstock and nitrogen fertilizer on postharvest anthracnose development in *Hass* avocado. Australasian Plant Pathology 35: 619-629.
- Xiangchun, M., Jun, L., Fangcheng, B., Lixue, Z., Zhiyu, M. 2015. Antifungal Activities of Crude Extractum from *Camellia semiserrata* Chi (Nanshancha) Seed Cake Against *Colletotrichum musae*, *Colletotrichum gloeosporioides* and *Penicillium italicum* in vitro and in vivo Fruit Test. The Plant Pathology Journal 31(4): 414–420.
- Xu, X. F., T. Lin, S. K. Yuan, D. J. Dai, H. J. Shi, C. Q. Zhang, and H. D. Wang. 2014. Characterization of baseline sensitivity and resistance risk of *Colletotrichum gloeosporioides* complex isolates from strawberry and grape to two demethylation-inhibitor fungicides, prochloraz and tebuconazole. Australasian Plant Pathology 43: 605-613.
- Yahia EM, Gonzalez-Aguilar G (1998). Use of passive and semi-active atmospheres to prolong the postharvest life of avocado fruit. Food Sci. Technol. 31(7-8):602-606.
- Yanar, Y., A. Gökçe, I. Kadioglu, H. Çam, and M. Whalon. 2011. In vitro antifungal evaluation of various plant extracts against early blight disease (*Alternaria solani*) of potato. African Journal of Biotechnology 10 (42): 8291-8295.

- Yazdani, D., Tan, Y. H., Zainal, A. M. A. y Jaganath I. B. 2011. A review on bioactive compounds isolated. *Journal of Medicinal Plants Research* 5(30): 6584-6589.
- Zhang, P. F., L. F. Zhai, X. K. Zhang, X. Z. Huang, N. Hong, W. X. Xu, and G. P. Wang. 2015. Characterization of *Colletotrichum fructicola*, a new causal agent of leaf black spot disease of sandy pear (*Pyrus pyrifolia*). *European Journal of Plant Pathology* 143 (4): 651-662.
- Zheng, M., J. Shi, J. Shi, Q. Wang, and Y. Li. 2013. Antimicrobial effects of volatiles produced by two antagonistic *Bacillus* strains on the anthracnose pathogen in postharvest mangos. *Biological Control* 65: 200-206.

ANEXO 1

EXTRACCIÓN DE ADN

La extracción del ADN se realizó a partir del micelio de nueve aislamientos puros creciendo en PDA, mediante el método del CTAB 2 % (Doyle y Doyle, 1990) con ligeras modificaciones. Se precalentó el CTAB 2 % en baño maría, se agregó 1 mL de CTAB en un tubo Eppendorf de 2 mL y se colocó micelio con una punta de micropipeta, se incubó a baño María a 96 °C por 60 min y se mezcló a intervalos de 10 min, se centrifugó a 11,500 g por 5 min y se pasó el sobrenadante a tubos de 2 mL nuevos. Se agregó 500 µL de cloroformo-álcool isoamílico (24:1) y se agitó por inversión 10 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 11,500 g durante 10 min; se extrajo la fase acuosa y se colocó en tubos nuevos de 2 mL; se agregaron 700 µL de cloroformo-álcool isoamílico (24:1); se agitó por inversión durante 10 min y se centrifugó a 11,500 g por 10 min, se transfirió la fase acuosa a tubos nuevos de 1.5 mL con 950 µL de etanol al 100 % previamente enfriados a -20 °C, se mezcló muy suavemente por inversión por al menos 10 veces; se incubó por 2 h a -20 °C; se centrifugó a 11,500 g durante 30 min y se decantó evitando perder la pastilla. Posteriormente, se resuspendió la pastilla en 400 µL de agua HPLC e incubó a 55 °C por 15 min; se añadieron 34 µL de NaOAc 3M y 1 mL de etanol 95 % e incubó a -20 °C por 1 h, se lavó con 600 µL de isopropanol 70 % y centrifugó por 10 min a 11,500 g, se secó por 30 min; se resuspendió la pastilla en 50 µL de agua HPLC; se incubó a 80 °C por 10 min y se extrajo solo la parte superior del ADN dejando 10-20 µL de sobrenadante. Por último, se dio una agitación en vortex, se cuantificó por espectrofotometría y se almacenó a -20 °C.